

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica I



**Estudio galénico de distintas formulaciones de ácido
acetilsalicílico**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Santiago Torrado Durán

Directores

Rafael Cadorniga Carro

Juan José Torrado Valeiras

Madrid 2005

ISBN: 978-84-8466-946-3

© Santiago Torrado Durán, 1992

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA

ESTUDIO GALENICO DE DISTINTAS FORMULACIONES
DE ACIDO ACETIL SALICILICO.

Ponentes: Sr. Dr. CADORNIGA Y TORRADO V.

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. JOSÉ-LUIS LASTRES

Vocal: Sr. Dr. EUGENIO SELLES

Vocal: Sr. Dr. FRANCISCO ZARAGOZA

Vocal: Sr. Dr. ISABEL CAYRE

Secretario: Sr. Dr. PALOMA FRUTOS

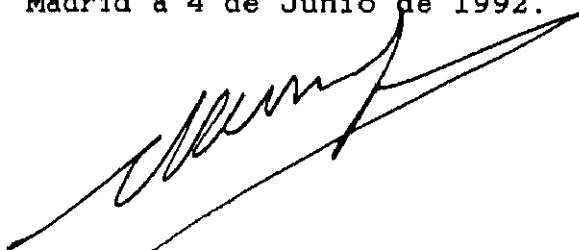
Memoria presentada para optar al Grado de
Doctor por Santiago Torrado Durán.

Madrid. Mayo, 1992.

RAFAEL CADORNIGA CARRO, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que el trabajo de investigación titulado "Estudio Galénico de Distintas Formulaciones de Acido Acetil Salicílico", ha sido desarrollado por D. Santiago Torrado Durán en este Departamento, bajo la dirección conjunta de los doctores D. Juan José Torrado Valeiras y D. Rafael Cadórniga Carro, y constituye su memoria para optar al Grado de Doctor en Farmacia.

Madrid a 4 de Junio de 1992.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Cadórniga Carro', written over a long, sweeping horizontal line that extends across the page.

Fdo: R. Cadórniga Carro.

AGRADECIMIENTOS:

Mi agradecimiento al profesor Dr. D. Rafael Cadórniga Carro, codirector de la presente memoria, por su constante estímulo y apoyo demostrado a lo largo de todo el trabajo.

A mi padre el profesor Dr. D. Juan José Torrado Valeiras, codirector de la presente memoria, por haberme aconsejado y ayudado siempre durante toda mi formación.

A mis hermanos Juan José y Susana con cuya colaboración y gracias a los cuales se pudo realizar este trabajo.

A todos mis compañeros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.

Abreviaturas.

Generales.

AAS - Acido acetil salicílico
AS - Acido salicílico
AG - Acido gentísico
AINE - Antiinflamatorios no esteroídicos
GAS - Glucurónido acil salicílico
GFS - Glucurónido fenólico salicílico
SU - Acido salicilúrico
EL - Eficacia lubricante
FMPI - Fuerza máxima del punzón inferior
FMPS - Fuerza máxima del punzón superior
RE - Recuperación elástica
Sl - Salicilatos libres
St - Salicilatos totales
TD50 - Tiempo de disolución del 50%
TD80 - Tiempo de disolución del 80%.
%D30 - Porcentaje disuelto a los treinta minutos

Estadística.

a - Ordenada en el origen
b - pendiente
F - Valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad
r - Coeficiente de correlación
 r_0 - correlación para un orden cero

r_1 - Coeficiente de correlación para un orden uno
 S_y - Varianza
 S_a - Desviación estandard de la ordenada
 S_a^2 - Varianza de la ordenada
 S_b - Desviación estandard de la pendiente
 S_b^2 - Varianza de la pendiente
 $S_b \text{ rel } \%$ - Desviación estandard relativa
 $S_t (\%AS)$ - Desviación estandard del periodo de validez
 S_z - Desviación estandard del valor estadístico Z
 $S^2_t (\%AS)$ - Varianza del valor estimado de validez
 t - Valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad
 $t (\%AS)$ - Periodo de validez experimental en función del $\%AS$ libre permitido

Parámetros farmacocinéticos.

Parámetros	Símbolo	Unidades
Cantidad total excretada en orina desde tiempo cero hasta t	X_{mc}	mg
Velocidad de excreción urinaria	V_{ex}	mg/h
Velocidad de excreción urinaria máxima	$V_{ex \text{ max}}$	mg/h
Tiempo al que aparece $V_{ex \text{ max}}$	t_{max}	h
Constante de eliminación	K_e	h^{-1}
Biodisponibilidad relativa en función de X_{mc}	$BR (X_{mc})$	%

Indice.

	<u>Pag.</u>
INTRODUCCION.....	1
OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO.....	4
PARTE GENERAL.....	7
I. Acido acetil salicílico (AAS). Características generales.....	8
I.1. Características físicas y químicas.....	8
I.2. Formulaciones y aplicaciones terapéuticas.....	10
I.3. Técnicas analíticas.....	11
I.4. Estabilidad.....	11
II. Características biofarmacéuticas y farmacociné- ticas.....	15
II.1. Absorción.....	15
II.2. Distribución.....	16
II.3. Metabolismo y excreción.....	17
II.4. Factores de formulación que afectan su absor- ción y biodisponibilidad.....	20
II.5. Interacciones.....	25
III. Aplicaciones terapéuticas.....	28
III.1. Analgesia.....	29
III.2. Antiartrítico.....	32
III.3. Acción uricosúrica.....	35
III.4. Antipiresis.....	36
III.5. Prevención y tratamiento de procesos tromboem- bólicos.....	37
III.6. Procesos metabólicos.....	38
III.7. Otros.....	40

	<u>Pág.</u>
IV. Irritabilidad gástrica producida por AAS. Sustancias protectoras.....	44
IV.1. Acción sistémica por inhibición de la ciclooxigenasa.....	45
IV.2. Acción irritante tópica.....	45
IV.3. Efecto irritante de algunas formas farmacéuticas del AAS.....	46
IV.4. Sustancias protectoras.....	46
PARTE EXPERIMENTAL.....	55
Material y Métodos.....	56
1. Reactivos e instrumental.....	57
2. Métodos analíticos.....	60
2.1. Cromatografía en capa fina.....	62
2.2. HPLC (cualitativo).....	62
2.3. Espectrofotometría ultravioleta.....	65
2.4. Espectrofotometría de segunda derivada.....	67
2.5. Fluorimetría.....	69
2.6. Colorimetría.....	71
2.7. HPLC (cuantitativo).....	74
2.8. Validación.....	76
3. Formulación.....	80
3.1. Proceso de fabricación y composición cuantitativa de las distintas formulaciones.....	80
3.2. Estudio físico de la compresión de distintas formulaciones.....	90
3.3. Características y ensayos farmacotécnicos de las distintas formulaciones.....	93
4. Estabilidad.....	98

	<u>Pag.</u>
5. Gastrototoxicidad.....	104
6. Biodisponibilidad relativa.....	107
SULTADOS Y DISCUSION PARCIAL.....	112
1. Características y validación de los métodos de análisis utilizados.....	113
2. Características farmacotécnicas.....	121
3. Estudio de estabilidad.....	154
4. Gastrototoxicidad.....	168
5. Biodisponibilidad relativa.....	180
SCUSION FINAL.....	204
NCLUSIONES.....	215
ELIOGRAFIA.....	218

INTRODUCCION

INTRODUCCION.

El ácido acetil salicílico (AAS) es un medicamento de máximo interés, tanto por su amplio consumo como por las nuevas aplicaciones que aparecen continuamente. Por todo ello sus formulaciones galénicas se tienen que mejorar y revisar constantemente, para adecuarlas a los adelantos tecnológicos.

En nuestro Departamento ocupa una línea de trabajo que se asienta en publicaciones, tesinas y tesis y ha sido un quehacer galénico por parte de los directores de esta memoria.

Hemos centrado el trabajo experimental en el desarrollo galénico de distintas formulaciones de administración oral de AAS con distinta velocidad de cesión. Así mismo, se estudian sus características farmacotécnicas, estabilidad, gastrototoxicidad, así como biodisponibilidad relativa de distintas formulaciones. Concretamente en el caso de la biodisponibilidad se plantea la relación existente entre velocidad de cesión y porcentaje de la dosis de AAS administrado que llega a absorberse, no hemos de olvidar que según algunos autores existe una ventana de absorción para el AAS por lo que formulaciones de cesión sostenida pueden tener disminuida su biodisponibilidad relativa en comparación con formulaciones de cesión rápida.

Por todo ello la presente memoria de tesis constituye un trabajo muy amplio y completo que abarca un gran número de ensayos y distintos aspectos del desarrollo galénico de un

medicamento. La idea original ha sido investigar distintas posibilidades en el desarrollo de formulaciones de AAS para que posteriormente se puedan estudiar con mayor detalle y profundidad.

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

OBJETIVO Y PLANTEAMIENTO

Objetivo:

Formulación de comprimidos de AAS con tres acciones diferentes;

- analgésica
- antirreumática
- antitrombótica

Para todo ello nos basamos en la velocidad de cesión "in vitro", así como en el posterior estudio de biodisponibilidad relativa de aquellas formulaciones que reúnan las mejores características farmacotécnicas y de estabilidad.

Planteamiento:

1º - Puesta a punto de distintos métodos analíticos con la correspondiente validación. Entre los métodos utilizados se encuentran: espectrofotometría directa (en el punto isobéptico), espectrofotometría de segunda derivada, colorimetría, HPLC, cromatografía en capa fina y espectrofotometría. Según el tipo de ensayo se seleccionará el método analítico mas adecuado.

2º- Estudio farmacotécnico. Se elaboran distintas formulaciones a base de granulados, dispersiones sólidas y pelets, así como comprimidos. En total se preparan y evalúan unas 40 formulaciones de administración oral de AAS. En los

estudios farmacotécnicos de estas formulaciones nos centramos en dos características fundamentales:

- Comprensibilidad. Mediante una prensa hidráulica, con transductores piezoeléctricos de presión y desplazamiento.

- Velocidad de cesión "in vitro" de todas las formulaciones estudiadas y su comparación con algunas especialidades farmacéuticas comercializadas.

- Estudio de estabilidad. Se estudian las características de estabilidad química de algunas de las formulaciones a temperatura ambiente.

- Estudio de gastrotoxicidad. Se estudia la influencia del tamaño de partícula, velocidad de cesión y el uso de posibles sustancias gastroprotectoras de la irritación gástrica para este tipo de formulaciones.

- Estudio de biodisponibilidad relativa. Se eligen seis formulaciones con distintas características de velocidad de cesión y se administran a seis voluntarios. Mediante datos de excreción urinaria se estudia la biodisponibilidad relativa de estas formulaciones así como la posible relación existente entre su velocidad de cesión "in vitro" y la velocidad de excreción y biodisponibilidad relativa "in vivo".

PARTE GENERAL

I. ACIDO ACETIL SALICILICO (AAS). CARACTERISTICAS GENERALES.

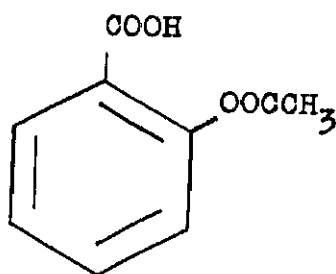
A continuación se describen de forma breve algunas características físicas y químicas del AAS, tipos de formulaciones existentes y aplicaciones terapéuticas, métodos analíticos y características de estabilidad. En los temas siguientes se tratará con más detalle algunos de estos aspectos.

I.1. Características físicas y químicas (Merck Index, 1989).

Sinónimos: aspirina, ácido 2-acetiloxi-benzoico, acetato del ácido salicílico, ...

Fórmula empírica: $C_9H_8O_4$

Fórmula desarrollada:



Peso Molecular: 180.15

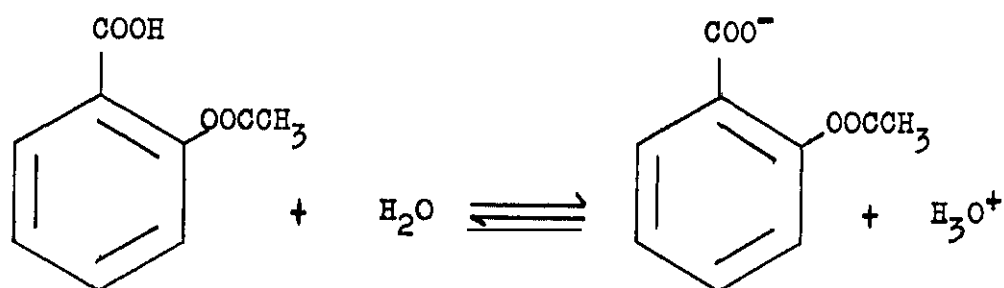
Densidad: 1.4 g/cm³

Punto fusión: 135°C

Características organolépticas: inoloro y con sabor ácido. Con humedad se degrada con facilidad a ácido salicílico (AS) y ácido acético de olor característico.

Solubilidades: 1 g de AAS se disuelve en 300 ml de agua a 25° C, en 100 ml de agua 37°C, en 5 ml de etanol, en 17 ml de cloro-formo y en 10-15 ml de éter.

Ionización (Florence y Attwood, 1988). Según la teoría de Lowry-Brönsted el AAS en solución acuosa se ioniza de la siguiente manera:



$$\text{pK}_a = 3.49$$

I.2. Formulaciones y aplicaciones terapéuticas del AAS (Martindale, 1989).

El AAS es un inhibidor de la enzima ciclooxigenasa, por lo que inhibe la biosíntesis de prostaglandinas. Esta actividad la tiene también el AS, principal metabolito del AAS.

La inhibición de prostaglandinas da lugar a su eficacia como analgésico, antiinflamatorio, antipirético y a su actividad antiplaquetaria (ver capítulo III).

Según su aplicación terapéutica se administra en distintas dosis y en distintas formas farmacéuticas. Las formas orales más comunes de administración son:

- Comprimidos convencionales.
- Comprimidos efervescentes.
- Comprimidos tamponados.
- Cápsulas.
- Comprimidos y cápsulas de cesión controlada.
- Comprimidos entéricos.
- Sobres.

Es frecuente la administración del AAS en preparados conteniendo varios principios activos.

I.3. Técnicas analíticas (Florey, 1979).

Existen distintas técnicas analíticas para la determinación tanto del AAS como de AS, principal producto de degradación y metabolización del AAS. Entre otras técnicas de análisis están:

- Colorimetría.
- Espectrofotometría ultravioleta.
- Espectrofotometría infrarroja.
- Fluorescencia.
- Volumetrías.
- Técnicas cromatográficas (papel, capa fina, columna, gases y HPLC).
- Electroforesis.

I.4. Estabilidad.

El AAS se hidroliza con facilidad a AS. El AS es muy ulcerogénico, por lo que las legislaciones sanitarias de distintos países limitan los valores máximos permitidos. En este sentido el AAS es una excepción a la regla del t_{90} . En las formulaciones de AAS la fecha de caducidad no viene definida por la regla del tiempo que tarda en degradarse un 10%, sino por la aparición del AS (los valores máximos permitidos varían según el tipo de formulación).

El AAS se hidroliza de la siguiente manera (Kelly, 1970) (Edwards, 1950) (Garrett, 1957):



La velocidad con que se produce esta reacción depende del tipo de formulación.

En suspensiones de AAS la cinética parece ser de orden cero (James, 1958).

En comprimidos con celulosa microcristalina se ajusta a una cinética de orden uno (Enezian, 1968).

En formas farmacéuticas sólidas (comprimidos) a altas temperaturas, pueden seguir una cinética que se ha descrito como topoquímica (Carstensen, 1974) (Nelson y col., 1974) en la que se alternan distintas velocidades de degradación.

Leeson y Mattocks (1958), estudiaron ya la estabilidad de formas sólidas de AAS descomponiéndose por una reacción en la que se produce una adsorción de agua desde la atmósfera que disuelve parte del AAS, hidrolizándolo por catálisis ácida del AAS disuelto, mientras que en ausencia de agua no se observa esta descomposición.

Connors (1986), indica que la degradación de formas sólidas de AAS se

ajusta a unas curvas de degradación con una fase sigmoideal, precedida de una fase más larga de aceleración. Esta fase de aceleración puede ajustarse a un aparente orden cero o uno, dependiendo de las condiciones de humedad y temperatura.

Después de lo expuesto es fácilmente comprensible que para evitar la degradación del AAS se recomienden envases herméticos y que se le aisle de la humedad y metales que puedan catalizar la reacción de degradación por hidrólisis.

Se han realizado numerosos estudios acerca del contenido en humedad y metales de distintos excipientes y su influencia en la degradación del AAS. Así, por ejemplo, cuando se estudió el efecto de distintos fluidificantes en la hidrólisis del AAS se comprobó que la estabilidad del AAS es mayor en el siguiente orden: aceite vegetal hidrogenado > ácido esteárico > talco > estearato aluminico (Kornblum y Zoglio, 1967). Con estearato magnésico aparece una mayor degradación uqe en los cass anteriores, que puede ser debida a que los iones de las sales de estearato catalizan la hidrólisis del AAS. Este efecto se puede inhibir por la utilización de derivados del ácido málico (Zoglio y col., 1968), que modifican el pH y compiten con el catión del estearato evitando su acción catalítica. Otro factor importante es la cantidad de agua presente en el excipiente, ya que a mayor porcentaje de agua en el mismo aumenta la degradación del AAS (Mandling, 1969).

Además de la reacción de hidrólisis se han descrito reacciones de transesterificación entre el AAS y excipientes como distintos tipos de polioxietilenglicol (bases para supositorios) (Jun y col., 1972) e incluso con otros principios activos como el paracetamol (Boggiano y col., 1970).

El AAS en presencia de sustancias de carácter básico como el bicarbonato sódico, se degrada debido a un proceso de hidrólisis (Knopp y col., 1989).

II. CARACTERÍSTICAS BIOFARMACEUTICAS Y FARMACOCINETICAS DEL AAS.

La mayoría de los datos existentes acerca de las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas del AAS, se basan en datos obtenidos gracias al análisis de salicilatos totales. Este hecho se debe, en parte a la rápida hidrólisis del AAS, y otra a que los distintos productos obtenidos por metabolización del AAS tienen, generalmente, una actividad terapéutica parecida al AAS.

A continuación describiremos las características biofarmacéuticas y farmacocinéticas del AAS y de sus metabolitos.

II.1. Absorción.

Después de su administración oral el AAS se puede absorber tanto en el estómago como en las primeras porciones del intestino delgado. Generalmente, la mayor parte del AAS se absorbe en las primeras porciones del intestino delgado, como se ha demostrado cuando al disminuir el tiempo necesario para el vaciamiento gástrico se aumentan las concentraciones plasmáticas del AAS (Truitt y Morgan, 1964).

La absorción es más rápida cuando el AAS se administra en forma de solución, los valores máximo de concentración se obtienen a los 15-25 minutos de su administración oral (Rowland y cols. 1967). La constante de absorción tiene una gran variabilidad interindividual y está influenciada

por las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal. Distintos estudios han comparado los valores de concentraciones plasmáticas del AAS obtenidas después de la administración oral e i.v. Se calcula que aproximadamente un 30% de la dosis de AAS administrado por vía oral se metaboliza a AS antes de su distribución sistémica. Esta metabolización se lleva a cabo en enzimas del tracto gastrointestinal así como en el hígado. Si consideramos la cantidad de la dosis inicial de AAS absorbida a partir de datos de área bajo la curva de AS, los porcentajes son de un 90-100% de la dosis inicial. Por todo ello, generalmente las formulaciones de AAS tienen buenas características de absorción, aunque una gran parte se metaboliza antes de alcanzar la circulación sistémica (Rowland y cols, 1972) (Leonards y Levy, 1965) (Levy y Jusko, 1967).

II.2. Distribución.

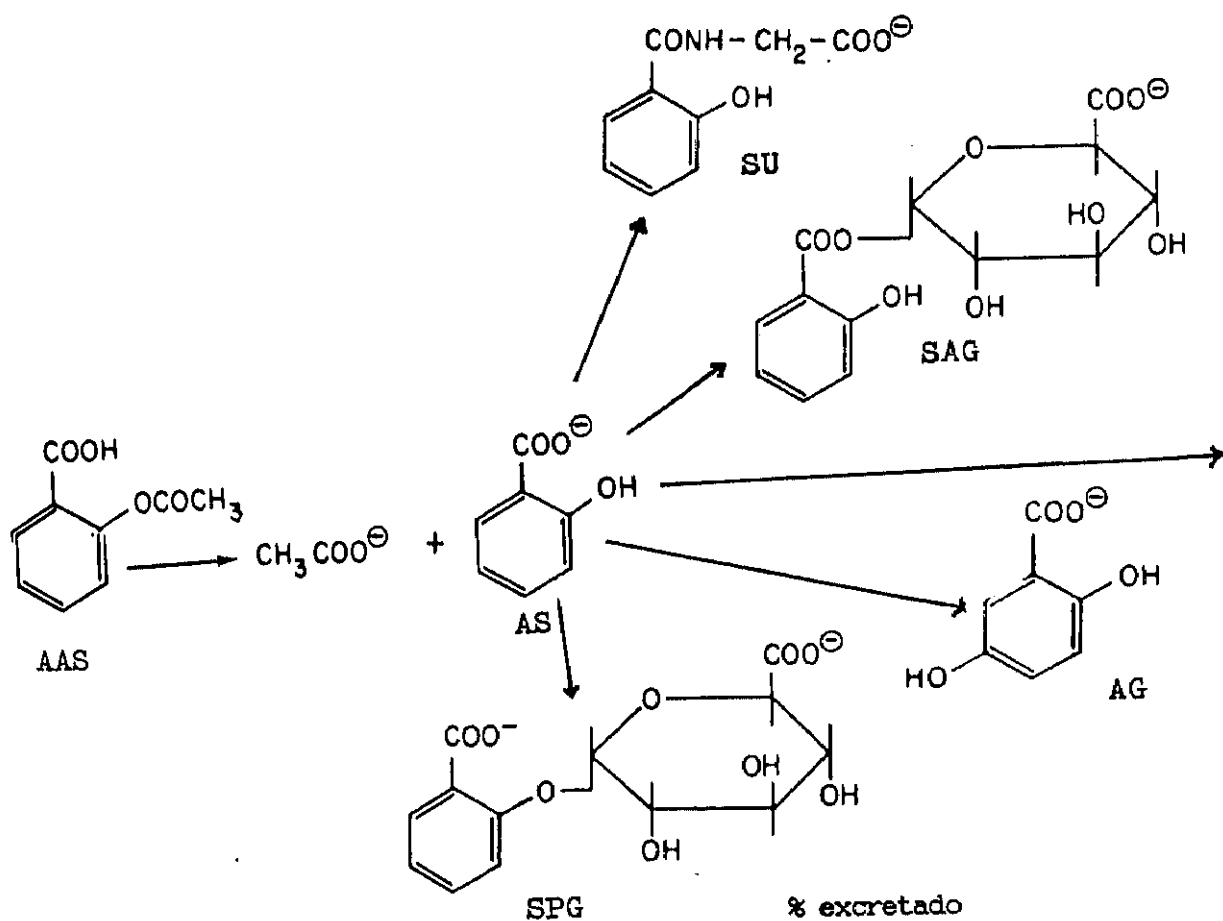
A concentraciones terapéuticas la mayor parte de los salicilatos se unen a las proteínas plasmáticas (mayoritariamente albúmina), el porcentaje de unión depende de las concentraciones de salicilatos y albúmina. A concentraciones bajas de salicilatos (40-50 mg/l), la unión está entre un 72-90% del total; cuando las concentraciones de salicilatos son mayores (150-200 mg/l) el porcentaje de unión varía entre 60-72% del total. La unión a proteínas es generalmente menor en enfermos con infecciones agudas y reuma, quizá por una disminución de las proteínas plasmáticas. La unión

del AAS a proteínas es menor en proporción que la del AS, ya que a una concentración del AAS de 370 mg/l sólo un 6% del AAS se encuentra unido a proteínas (Reynold y Cluff, 1960) (Kucera y Bullock, 1969). El volumen de distribución del AAS en su forma de salicilato de lisina es de 0.219 l/kg (Aarons y col. 1989) y del AAS es de 0.17 l/kg (Insel, 1990) (Gillies y col. 1986).

II.3. Metabolismo y Excreción.

Después de su administración i.v. el AAS se distribuye a distintos tejidos y se metaboliza y elimina con rapidez, de hecho su semivida de eliminación es de aproximadamente 15 minutos. Aproximadamente el 20% del AAS administrado se metaboliza en la sangre, mientras que las enzimas esterazas del hígado y otros tejidos metabolizan el resto del AAS. Se calcula que menos del 1% del AAS administrado se excreta en orina sin metabolizar (Rowland y Riegelman, 1968) (Harris y Riegelman, 1967) (Cummins y King, 1966).

La metabolización del AAS se puede ver esquematizado en la figura 1.



Michaelis Menten	SU	(50-75%)
1 orden	GAS	(5-10%)
1 orden	AS	(10-15%)
1 orden	AG	(5-10%)
Michaelis Menten	GFS	(10-20%)

Figura 1. Metabolitos del AAS y porcentaje excretado según diversos autores (Rainsford y Path, 1984) (Gilles y col, 1986) (Insel, 1990).

Debido a que el metabolito mayoritario del AAS, el AS, es farmacológicamente activo sus características farmacocinéticas son también importantes. La característica farmacocinética más importante del AS es que varios de los sistemas enzimáticos responsables de su metabolización tienen una capacidad limitante (siguen cinética de Michaelis-Menten). Por ello, si se aumenta la concentración de AS, disminuye su capacidad de metabolización. Así, la semivida de eliminación del AS aumenta con la dosis. La semivida del AS está comprendida entre 2 y 4 horas con dosis de AAS de 0.5 g. Cuando se aumenta la dosis a 10 g la semivida cambia a 20 horas (Levy, 1965). La capacidad de metabolización tiene una gran variabilidad interindividual (Levy y Hollister, 1964). Como consecuencia de esta semivida de eliminación dependiente de la dosis, si la cantidad de AAS administrada es excesiva por no estar ajustada correctamente, se produce toxicidad (Levy y Leonards, 1971) (Levy y col., 1975). La excreción urinaria de AS sin metabolizar depende del pH y puede oscilar entre un 2 y un 30 %, aunque existe una gran variabilidad interindividual. Valores normales pueden estar comprendidos entre un 4% (Levy, 1965), 10% (Insel, 1990) y un 15% (Gillies y col., 1986). El resto de salicilatos se elimina en forma de glucurónidos, ácido salicílico y ácido gálico (ver figura 1).

II.4. Factores de formulación que afectan su absorción y biodisponibilidad.

Teóricamente, la absorción de AAS de una formulación de administración oral, depende de su velocidad de disolución. Los resultados de los ensayos in vivo demuestran y correlacionan los resultados de disolución in vitro con los de absorción in vivo (Levy y cols. 1965b) (Gibaldi y Weintraub, 1970).

Debido a las distintas aplicaciones terapéuticas del AAS existen distintos tipos de formulaciones. La mayoría de cesión y disolución rápida para un efecto analgésico rápido, aunque también existen otras de cesión prolongada buscando un efecto antiinflamatorio (enfermos de artritis) o para el tratamiento de la trombosis arterial.

Entre las distintas formulaciones de administración oral las más utilizadas son:

- Comprimidos convencionales.
- Comprimidos efervescentes.
- Comprimidos tamponados.
- Cápsulas.
- Comprimidos masticables.
- Comprimidos entéricos.
- Comprimidos de acción prolongada.

- Microcápsulas y pelets.
- Sobres.

En los comprimidos convencionales de AAS, el tiempo de disgregación es un parámetro muy importante y que influye decisivamente en la velocidad de disolución y absorción del AAS.

Los comprimidos efervescentes de AAS son una buena forma de administración de AAS. En este tipo de formulaciones el AAS se ingiere en forma de solución. Generalmente los niveles plasmáticos de AAS y AS son mayores y se alcanzan con mayor rapidez después de la administración de soluciones efervescentes que en soluciones no efervescentes, aunque existen otros estudios en los que las diferencias de absorción no son significativas (Leonards, 1963). Cuando se comparan formulaciones efervescentes con formulaciones tamponadas y convencionales de administración oral de AAS, las formulaciones efervescentes dan lugar a una mayor rapidez de absorción y niveles mayores de concentración después de la primera hora de administración (Ekenved y col., 1975). Como ya hemos indicado anteriormente estas buenas características de absorción se debe a que el AAS se encuentra ya solubilizado en el momento de su administración; por otro lado existe un mayor vaciamiento gástrico y un aumento en el valor del pH gástrico (Davison y col., 1962).

La administración de formulaciones tamponadas tiene como fundamento el aumento de disolución del AAS al subir el pH. Las sustancias tamponantes

pueden aumentar el pH de los líquidos que rodean al AAS, este aumento en pH originaría un aumento en la solubilidad y en la absorción y disminuye la irritación producida por el contacto directo entre el AAS no disuelto y la mucosa gastrointestinal.

La elevación del pH con bicarbonato sódico mejora la disolución del AAS y facilita su absorción (Watanebe y col, 1982). Si el pH es muy alto se facilita la ionización, disminuye su absorción y aumenta la excreción urinaria de algunos salicilatos (Petersen y col, 1982) (Rainsford, 1984) (Bogentoft y col, 1983) (Martin, 1971). La toma de antiácidos a la vez reduce la biodisponibilidad (Levy y col, 1975) posiblemente por formación de complejos, por ejemplo con hidróxidos de aluminio. Formas galénicas tamponadas efervescentes ajustan sales alcalinas suficientes para elevar el pH intragástrico que aceleran la velocidad de absorción y mejoran la tolerancia local (Davidson y col, 1962). El CO_2 a su vez junto con la alcalinización acelera la evacuación gástrica y aumenta la absorción (Lolli y col, 1946).

La administración de AAS en cápsulas tiene generalmente malas características de absorción y biodisponibilidad, en comparación con formulaciones de comprimidos (Wood, 1965).

Las formulaciones de comprimidos masticables de AAS tienen buenas

características de absorción, ya que la disgregación de estos comprimidos es rápida y su disolución está favorecida. En algunas ocasiones se ha estudiado la utilización de sales de aluminio y AAS. Estas sales tienen malas características de solubilidad acuosa y un sabor más agradable que el AAS. Desgraciadamente estas sales parece que forman hidróxidos de AAS insolubles en el estómago y por ello se dificulta la disolución y absorción del AAS (Levy y Sahli, 1962) (Levy y Prokmal, 1962).

Formulaciones entéricas de AAS están diseñadas para evitar la disolución del AAS en el fluido gástrico. Las cubiertas entéricas se disuelven a pH del fluido intestinal, permitiendo que el núcleo del comprimido se disgregue, facilitando la disolución del AAS y su absorción. Este tipo de formulaciones requiere un cuidadoso control de calidad que asegure una disolución adecuada y reproducible. La cesión y disolución de este tipo de formulaciones depende y está condicionado por las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal, especialmente el vaciamiento gástrico, el tiempo de tránsito intestinal y el pH de las secreciones. Cualquier variación en estos factores puede modificar la velocidad de cesión y disolución del AAS. De hecho, este tipo de formulaciones puede tener problemas de absorción, por lo que su biodisponibilidad en algunas ocasiones es inferior a la de otros tipos de comprimidos (Clark y Lasagna, 1965) (Green, 1966) (Canada y Little, 1975).

Comprimidos de cesión sostenida de AAS se han sugerido para el tratamiento de artritis y más recientemente para la prevención y tratamiento de la patología arterial trombótica. En este tipo de formulaciones se controla la velocidad de cesión del AAS y por ello su absorción. Con estas formulaciones se pretende conseguir unas concentraciones plasmáticas más constantes y con menos fluctuaciones que con las formulaciones convencionales de administración oral de AAS. Al igual que en el caso de los comprimidos entéricos las características de biodisponibilidad de estas formulaciones suelen ser peores que en formulaciones convencionales (Hollister, 1972).

Las microcápsulas y/o pelets son partículas formadas por un núcleo que se encuentra recubierto por membranas. Según el tipo de membrana pueden tener distintos tipos de velocidad de cesión. En ocasiones pueden ser formulaciones de tipo entérico y en otras ocasiones pueden ser de cesión sostenida. Existen trabajos en los que se demuestra que la absorción de este tipo de formulaciones es buena, que dan lugar a concentraciones plasmáticas estables y prolongadas y que pueden disminuir la irritabilidad de la mucosa gástrica y son mejor toleradas que formulaciones convencionales. Este tipo de formulaciones multiparticulares son ideales para conseguir una acción antitrombótica (Lachat y col., 1967) (Bell y col., 1966) (Vignalau y Beck, 1967) (Wiseman, 1969) (Khalil y El-Gamal, 1971 y 1973) (Khalil y col., 1971b) (Roberts y col., 1984) (Roberts y col., 1986).

Otra vía de administración del AAS es la vía rectal, aunque con malas características de absorción, entre un 20-40% de la dosis inicial administrada (Gibaldi y Grunhofer, 1975).

La biodisponibilidad de las formulaciones de AAS está vinculada a la ingesta de alimentos (Koch y col., 1978), al tamaño de partícula (Lastres y col., 1981) y al sexo (Gadalla y col., 1989) (Aarons y col., 1989) (Roberts, 1983) (Trnavska y Trnavsky, 1983) (Ho y col., 1985) (Netter y col., 1985) (Montgomery y col., 1986) (Jorup-Ronstrom y col., 1986) (Miners y col., 1986) (Grigor y col., 1987).

II.5. Interacciones.

La amplitud de la actividad del AAS, que abarca a un gran número de sistemas biológicos, explica el hecho de que el AAS interactúe con fármacos tan heterogéneos como los anticoagulantes, antiepilépticos, antidiabéticos, antibióticos, diuréticos, etc. Estas interacciones pueden ser muy frecuentes e incluso escapar al conocimiento y control del médico al ser el AAS un fármaco tan común en preparados que se utilizan, sin prescripción, para una gran variedad de síntomas. Las consecuencias clínicas de su combinación con otros medicamentos no son siempre conocidas, y en los casos en que se han estudiado pueden ser desde potencialmente peligrosas hasta potencialmente beneficiosas.

En principio cabe pensar que el AAS podría desplazar de su unión a la albúmina a todos aquellos fármacos que circulan unidos a esta proteína, interferir con los sistemas de transporte tubular renal para ácidos, competir con algunas vías metabólicas de conjugación de fármacos y, más en general, modificar los efectos de todos aquellos medicamentos en cuyo mecanismo de acción tengan algo que ver las prostaglandinas (Azanza y Cuenca, 1986).

A continuación se puede ver un resumen de las interacciones (Perrin, 1991).

Aumentan el nivel de AAS. Paracetamol, codeína, dextropropoxifeno, opiáceos, hidroxycloquinás, cimetidina, propanolol, alcohol y cafeína.

Disminuyen el nivel de AAS. Corticosteroides, antiácidos, bicarbonato sódico y antiinflamatorios no esteroideos.

El AAS disminuye las concentraciones de:

- Anticoagulantes cumarínicos
- Ácido úrico (a dosis bajas) de ahí su contraindicación con uricosúricos como probenecid y sulfipirazona...

El AAS aumenta el efecto de:

- Hipoglucemiantes orales
- Metotrexato.

Por otra parte el AAS no modifica la litemia ni la respuesta a la trinitrina.

III. APLICACIONES TERAPEUTICAS DEL AAS.

Los salicilatos en forma de extractos vegetales se han utilizado con distintas aplicaciones, entre otras para el tratamiento de la gota, dolores y como antipirético. A partir del siglo XIX el AAS puro y su sal sódica estaban disponibles para su uso, fundamentalmente para el tratamiento de procesos de artrosis. Sin embargo no fue hasta la década de los 60 cuando se realizaron ensayos controlados de actividad terapéutica de los salicilatos, en la mayoría de los estudios se consideraba la actividad del AAS como patrón y se comparaba con la de otros nuevos antiinflamatorios.

Además de la actividad antiinflamatoria, existen otras aplicaciones relativamente modernas como la del tratamiento de alteraciones tromboembólicas. En cualquier tratamiento se ha de tener presente los beneficios y las posibles contraindicaciones y efectos secundarios.

El AAS se puede utilizar con los siguientes fines terapéuticos:

- Analgésico para el tratamiento de dolor de cabeza, migraña y dolor quirúrgico, post-parto, menstrual y cáncer.
- Antiartrítico. Tratamiento de artritis reumática, osteoartritis, artritis juvenil reumática y fiebre reumática.

- Úricosúrico para el tratamiento de la gota, a dosis de 4-6 g/día.
- Antipirético.
- Prevención y tratamiento de alteraciones tromboembólicas en arterias coronarias, infartos, arterosclerosis, embolia pulmonar, problemas vasculares periféricos, etc.
- Alteración de procesos metabólicos como diabetes mellitus, hipertiroidismo y obesidad.
- Otros procesos como: tratamiento dermatológico, antidiarreico, antitumoral y antiviral.

III.1. Analgesia.

III.1.1. Cefaleas y migrañas.

Antes de comenzar una terapia con analgésicos conviene saber que tipo de dolor de cabeza es el que tiene el enfermo. Todos los salicilatos (incluidos AAS y diflunisal) son capaces de aliviar el dolor de cabeza. Sin lugar a dudas, y como demuestra su amplia utilización, el AAS es útil y eficaz para el tratamiento de los dolores de cabeza de tipo psicogénico y de tipo vascular (no migraña). Lo que no está tan claro es su utilidad

en la prevención y tratamiento de la migraña (Berkow, 1977).

Curiosamente, se ha demostrado recientemente que los enfermos de migraña tienen aumentada la agregación plaquetaria; por ello, inhibidores de esta agregación (entre otros AAS) pueden ser útiles para la prevención y tratamiento de la migraña. Alteraciones en la recaptación de serotonina, junto con acumulación de plaquetas en vasos cerebrales e hiperproducción de prostaglandinas y tromboxano A_2 , pueden ser el nexo de unión entre serotoninas y prostaglandinas en este proceso. Un aspecto importante que precisa una mayor aclaración es la relación entre la actividad de las plaquetas en el proceso de vasoconstricción que se produce después de una vasodilatación en un ataque de migraña. Este proceso tiene implicaciones terapéuticas, ya que si se produce un acúmulo de plaquetas junto con valores anómalos de las sustancias vasoconstrictoras tromboxano A_2 y PGF_2 justo después de la vasodilatación causada por PGI_2 se origina la migraña. Para el tratamiento es importante optimizar la dosis de AAS y conocer cuál es el momento oportuno para su administración y poder conseguir así la acción deseada (Deshmukh y col, 1976) (Horrobin, 1977) (Malmgren y col, 1978) (Oxman y col, 1982) (Farre y col, 1989).

III.1.2. Dolor quirúrgico.

AAS es equiparable o incluso superior al paracetamol en el alivio del

dolor postquirurgico (Cooper, 1981) (Seymour y Rawlins, 1981). Así mismo su mezcla con paracetamol, pentazocina y codeína es también eficaz. Su acción se ha comparado con indoprofen, proquazona, suprofen, ácido triapofénico y fenbufen, siendo generalmente más eficaz el AAS que estos productos (Cooper y col, 1980) (Baird y Tweek, 1980) (Mehlish, 1981) (Beaver, 1981) (Van Kalfschoten y cols, 1981) (Hutlin y Olander, 1981) (Forbes y col, 1980) (Dibiasi y Gnudi, 1980).

Generalmente se recomienda la administración de AAS después de la operación y no antes. Si por alguna razón se requiere la administración antes de la operación se recomienda la elección de diflunisal, ya que este medicamento no produce inhibición de la agregación plaquetaria y no aumenta el tiempo de sangría (Hepso y col, 1976) (Majerus y Stanford, 1977).

III.1.3. Dolor post-parto.

La aplicación de salicilatos, o extractos vegetales con los mismos, para el tratamiento del dolor post-parto es histórica y se remonta a la época de los romanos. Su eficacia es comparable a la de cualquier otro analgésico antiinflamatorio no esteroídico (Bloomfield S.S y col, 1987) (Bloomfield y col, 1977) (Bledinger y Eberlein, 1980) (Korttila y col, 1980).

III.1.4. Dolor menstrual.

El AAS se puede utilizar en el tratamiento de los dolores que frecuentemente aparecen en las mujeres durante la menstruación. En la actualidad está demostrada su eficacia mediante distintos estudios clínicos, aunque todavía faltan datos que permitan ajustar y optimizar las dosis y tiempo de administración para obtener la máxima eficacia (Berkow, 1977).

III.1.5. Dolor en cáncer.

La mezcla de AAS con paracetamol o zomepirac parece ser eficaz en el tratamiento del dolor causado en enfermos de cáncer (Stambaugh y Sarajian, 1981).

III.2. ANTIARTRITICO.

III.2.1. Artritis reumática.

Hasta la llegada de la indometacina, fenilbutazona y derivados del ácido acético y propiónico, el AAS fue el medicamento más eficaz para el tratamiento de la artritis reumática (Lee y cols, 1974) (Brooks, 1978) (Brooks y Buchanan, 1976). Hoy en día se le considera como la sustancia de

referencia para el estudio de nuevos antiartríticos, y es frecuente su utilización junto con otros medicamentos en el tratamiento de la artritis reumática. Para muchos autores el AAS es, al menos, igual de eficaz que cualquier otro antiinflamatorio no esteroídico para el tratamiento del dolor en procesos reumáticos (Paulus y Furst, 1979) (Simon y Mills, 1980) (Chasovminova y col, 1990) (Vanags y col, 1990).

La mayor ventaja del AAS en comparación con otros agentes antiartríticos es su precio y su accesibilidad, ya que no existen problemas para su dispensación (Simon y Mills, 1980). Las ventajas de los nuevos medicamentos antiartríticos en comparación con el AAS son una menor frecuencia de administración (generalmente tienen una semivida mayor que el AAS), la dosis menores y generalmente mejor aceptadas por el enfermo que el AAS.

Para el tratamiento del dolor en procesos reumáticos se recomiendan dosis de 0.6-1.2 g. Para conseguir una acción antiinflamatoria se necesitan dosis de 4-6 g por día.

El AAS es útil para el tratamiento del dolor y de algunos de los procesos de inflamación que se producen durante la artritis. Como tratamiento sintomático el AAS es superior a placebos, a otros antiinflamatorios no esteroídicos ácidos y al paracetamol (Lee y col, 1976).

La cuestión de si el AAS y otros antiinflamatorios son capaces o no de remitir el proceso reumático, es algo cuya respuesta no es tan clara y varía según autores.

III.2.2. Osteoartritis.

El AAS se suele utilizar como analgésico en el tratamiento de la osteoartritis. En estudios a doble ciego ha demostrado ser tan eficaz como el fenoprofen y naproxen, aunque peor tolerado por el tracto gastrointestinal (Diamond, 1976) (Melton y col, 1978). Diflunisal y piroxicam, son iguales o más eficaces que AAS (Caruso y col, 1978) (Essigman y col, 1979). Así mismo, sulindac e indometacina, son también más eficaces, pero también más tóxicos que AAS por el gran número de efectos secundarios que tienen (Bower y col, 1979) (Rainsford, 1982) (Rainsford, 1984).

Sin lugar a dudas el AAS es el analgésico antiinflamatorio más barato para el tratamiento de la osteoartritis, aunque otros como diflunisal tienen como ventaja que son menos tóxico para el tracto gastrointestinal.

III.2.3. Artritis reumática juvenil.

El AAS se utiliza en el tratamiento de la artritis reumática juvenil a dosis de $90-130 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, generalmente sin problemas, aunque a dosis altas se recomienda su monitorización.

III.2.4. Fiebre reumática.

El AAS es el medicamento de elección para el tratamiento de la fiebre reumática. Las dosis iniciales en niños y adolescentes son de 60 mg Kg^{-1} divididas en 4 dosis diarias. Si los síntomas se mantienen se puede aumentar la dosis hasta $180 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$. En la mayoría de los casos este tratamiento es suficiente, y en los casos en que no exista remisión de los síntomas al cabo del cuarto día se recomienda el uso de corticosteroides (Berkow, 1977).

III.3. Acción uricosúrica.

AAS o cualquier salicilato a altas dosis ($>3.5 \text{ g día}^{-1}$) induce uricosuria, por lo que puede ser útil para el tratamiento de la gota. A bajas dosis los salicilatos inducen retención del ácido úrico, por lo que a estas dosis están contraindicados en enfermos de gota. Por otro lado, parece que los salicilatos pueden antagonizar la acción de algunos medicamentos uricosúricos, por lo que se debe tener cuidado cuando se

administran de forma conjunta para evitar posibles interacciones (Fanelli y Weiner, 1979) (Schlosstein y col, 1973) (Diamond y col, 1980).

El AAS y los salicilatos parece que desplazan al ácido úrico de su unión en la albúmina. El doble efecto del AAS en los niveles de ácido úrico parece explicarse porque a pequeñas dosis el AAS disminuye la secreción tubular del ácido úrico en el riñón, mientras que a altas dosis inhibe la reabsorción tubular de ácido úrico dando como resultado una filtración glomerular completa del ácido úrico (Postlethwaite y col, 1974).

III.4. Antipiresis.

El tratamiento de la fiebre fue una de las primeras aplicaciones terapéuticas de los salicilatos. No existe ninguna duda acerca de la eficacia de los salicilatos en el tratamiento de la fiebre.

Históricamente aminopirina y dipirona también se utilizaron mucho como antipiréticos hasta que debido a problemas de agranulocitosis y otros efectos hemáticos se suspendió su utilización. En el tratamiento de la fiebre en niños pequeños también es muy frecuente el empleo de paracetamol, que tiene como ventaja una menor toxicidad especialmente en niños (el AAS puede producir el síndrome de Reyes en niños con fiebre y

deshidratación) (Insel, 1990). El control de la fiebre en la infancia es particularmente importante por el daño que puede producir la fiebre en el SNC de los niños durante un período en el que hay desarrollo cerebral y mielinización (Jaffe, 1981).

III.5. Prevención y tratamiento de procesos tromboembólicos.

El uso de AAS en la prevención de procesos tromboembólicos tiene un gran interés desde que en 1968 se publicaron varios artículos acerca de la actividad inhibidora de la agregación plaquetaria de este medicamento (Evans y col, 1968) (Zucker y Peterson, 1968) (O'Brien, 1968) (Weiss y col, 1968). Desde hace mucho tiempo se sabía que el AAS aumenta el tiempo de sangría; el interés se centraba en estudiar la posible relación con la aparición de hemorragias gastrointestinales. A partir de 1969 se plantea la posibilidad de la utilización terapéutica del efecto antiagregante plaquetario para el tratamiento de distintos procesos tromboembólicos en arterias coronarias, aterosclerosis, infarto, embolias pulmonares, desordenes vasculares y trombosis. La aplicación terapéutica del AAS, o de otros antiinflamatorios no esteroídicos, o mezclas con prostaciclina u otros agentes antitrombóticos tiene un gran interés. Se han realizado numerosos estudios y ensayos clínicos y en la actualidad se encuentra

aceptado su empleo como tratamiento preventivo de enfermedades vasculares, aunque todavía existen algunos puntos por aclarar en este tipo de actividad (Barnett, 1982) (Mustard, 1982) (Grenton, 1982) (Salzman y Harris, 1982) (Moncada y Vane, 1981) (Kranz, 1981) (Peto y col, 1988) (El-Wood y cols, 1988) (Uk-Tia, 1988) (Salenius y col, 1989) (Isis-2, 1988) (Benigui y col, 1989) (Schill y col, 1989) (Nordestgaard y col, 1990) (Yamada y col, 1990) (Mueller y col, 1990).

III.6. Procesos metabólicos.

El AAS y otros salicilatos tienen distintos efectos (generalmente inhibidores) en tejidos y metabolismo corporal. El interés se ha centrado en la posible utilidad terapéutica de salicilatos como parte del tratamiento de la diabetes, en hipertiroidismo y en algunos otros procesos metabólicos (Smith y Dawkins, 1971).

III.6.1. Diabetes mellitus.

Desde que en 1875 (Ebstein y Muller, 1875) (Ebstein, 1876) se supo que los salicilatos a dosis elevadas eran capaces de disminuir la excreción

urinaria de azúcar en diabéticos se comenzó a especular acerca de la posible actividad antidiabética de estos productos.

Posiblemente los salicilatos disminuyen la producción de glucosa en diabetes por inhibición del proceso metabólico y al impedir la fosforilación oxidativa en tejidos periféricos (tejido muscular y adiposo), que son normalmente fuentes de glucosa. Los salicilatos también inhiben la liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo. Los salicilatos pueden tener acción en centros que regulan los niveles de glucosa en sangre (Smith y Dawkins, 1971) (Vik-Mo y col, 1978) (Belsare, 1981).

III.6.2. Hipertiroidismo.

Los salicilatos mimetizan algunos de los efectos de la tiroxina (por ejemplo aumentan la temperatura corporal). Sin embargo, esta acción se debe al desplazamiento de la tiroxina (T_4) y de otras sustancias relacionadas (como T_3), de sus lugares de unión en proteínas plasmáticas, aumentando por ello la excreción urinaria de estas sustancias. Además se produce un bloqueo de la conversión de T_4 , T_3 y rT_3 a 3, 3-diidotirosina, así como una inhibición en la producción de TSH (hormona estimulante del tiroi-des). La inhibición de la síntesis y el aumento de la eliminación de hormonas tiroideas, justifica su empleo en hipertiroidismo, así mismo su

acción tironinomimética favorece la homeostasis tisular. La utilización conjunta de AAS y prednisolona parece ser clínicamente eficaz en el tratamiento del hipertiroidismo (Langer y cols, 1981) (Chopra y Solomon, 1980) (Yamamoto, 1979).

III.6.3. Obesidad.

Los salicilatos pueden ser útiles en el tratamiento de la obesidad como consecuencia de la acción catabolizadora de estos medicamentos. Los salicilatos pueden atenuar la alta capacidad metabolizadora característica en un gran número de obesos por lo que pueden ser útiles.

Se ha comprobado que la administración prolongada de grandes dosis de AAS o salicilatos $> 200 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ lleva a pérdidas de peso en animales de experimentación (Smith y Dawkins, 1971).

Esta posible aplicación del AAS es todavía especulativa y se necesitan más datos para poder confirmar la posible utilidad del AAS en el tratamiento de la obesidad.

III.7. Otras posibles aplicaciones.

III.7.1. Dermatología.

AS se podría utilizar como agente queratolítico en el tratamiento de callosidades e hiperqueratosis. También en el tratamiento del acné, pie de atleta, eczema, erisipela y otras enfermedades de la piel (Elie y col, 1983).

III.7.2. Diarrea.

El AAS puede inhibir la hiperproducción de prostaglandinas en el tracto gastrointestinal, que pueden causar diarrea (Collier, 1974). Un grave inconveniente es el efecto irritante de los salicilatos sobre la mucosa gastrointestinal. Esta acción puede ser todavía más lesiva en las mucosas debilitadas en procesos de diarrea.

III.7.3. Actividad antitumoral.

Parece ser que el AAS tiene una cierta actividad antitumoral en algunos tipos de cánceres experimentales (Wood y Hilgard, 1972) (Livolsi, 1973) (Powles y col, 1973) (Hial y cols, 1976). Los resultados de algunos autores sugieren que el efecto inhibitorio del crecimiento de tumores parece deberse a una inhibición en la síntesis de algunas prostaciclina. También puede ser debido a una inhibición en la síntesis de proteínas y

ácidos nucleicos, así como una inhibición en la actividad de ciertos linfocitos que pueden causar un crecimiento del tumor (Lynch y cols, 1978).

III.7.4. Actividad antiviral.

AAS inhibe la replicación de ciertos virus, aunque tiene poca eficacia si se compara con otros agentes antivíricos. Su mecanismo de acción parece deberse a una inhibición en la síntesis de ácidos nucleicos, aunque faltan datos que lo confirmen. También parece que el AAS es capaz de estimular la producción de interferón lo que aumenta la actividad antivírica del organismo (Dennis, 1979) (Geber y cols, 1975).

A título de resumen de sus aplicaciones se adjunta la siguiente relación de indicaciones (Perrin, 1991):

Analgesia

- Dolor de cabeza y migraña
- Dolor quirúrgico

Antiinflamatorio

- Parálisis reumatoide
- Artritis reumatoide juvenil
- Fiebre reumática

Antálgico

- Antipirético

Angor e infarto

- Prevención secundaria
- Prevención primaria

Angor inestable

Angioplastia transluminal

Puenteo coronario

Prótesis valvulares

Accidentes cerebrovasculares

Complicaciones diabéticas

- Vasculares
- Retinopatía
- Arteritis
- Nefropatías

Prevención de migrañas

Prevención de la pre-eclampsia

Prevención de la catarata

Enfermedad Kawasaki

Hipercalcémias para-neoplásicas

Gripe.

IV. IRRITABILIDAD GÁSTRICA PRODUCIDA POR AAS. SUSTANCIAS PROTECTORAS.

Los analgésicos antiinflamatorios no esteroídicos (AINE) son ampliamente utilizados en el tratamiento crónico del dolor y de procesos inflamatorios como artritis ósea y reumática. Tanto el ácido acetilsalicílico (AAS) como otros antiinflamatorios AINE producen lesiones e irritaciones del tracto gastrointestinal en animales de experimentación y en humanos (Katz y Shriver, 1989) y posiblemente este es su efecto secundario mas importante.

La irritabilidad gástrica de una sustancia puede ser debida a una acción tópica, es decir por contacto directo de ese producto con la mucosa, o puede deberse a una acción sistémica, en este último caso la acción irritante se produce independientemente de la vía de administración.

En el caso del AAS, el mecanismo de irritabilidad es doble (Hansen y col., 1980) y se produce tanto por una acción irritante por contacto directo con la mucosa gástrica, como por una acción sistémica del AAS.

IV.1. Acción sistémica por inhibición de la ciclooxigenasa.

Tanto el AAS como otros analgésicos AINE inhiben la acción de la enzima ciclooxigenasa. Esta enzima es necesaria en la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico (Kaufman, 1989). La falta de prostaglandinas I_2 y E_2 en la mucosa gástrica produce vasoconstricción, disminuye el flujo sanguíneo y, como consecuencia se debilitan las membranas de la mucosa gástrica, por lo que es más sensible a la acción irritante de distintas sustancias (Rainsford y col., 1980).

IV.2. Acción irritante tópica del AAS.

El AAS tiene acción irritante local de las mucosas gastro-intestinales (Fara y Myrback, 1990) (Benerjee, 1990). Esta acción local se combina con la acción sistémica originada por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, y es especialmente importante en pacientes con artritis en los que se administran de forma continuada varias dosis de AAS y otros agentes AINE durante periodos de tiempo prolongados.

Otro factor importantísimo en la irritabilidad tópica es el porcentaje de ácido salicílico (AS), en el AAS, ya que debido al mayor efecto irritante del AS, el contenido del mismo debe ser siempre el menor posible.

IV.3. Efecto irritante de algunas formas farmacéuticas de AAS.

La acción irritante sistémica del AAS, no se puede evitar mediante la modificación galénica de la formulación. Sin embargo, la acción tópica si se puede evitar o al menos disminuir (Fara y Myrback, 1990). Con este fin se formulan formas farmacéuticas de administración oral de menor velocidad de cesión (como comprimidos recubiertos de AAS), o formas taponadas para disminuir la acidez gástrica y disminuir la irritabilidad. Así mismo, es posible la utilización de vías alternativas de administración de AAS, como son la vía rectal o la parenteral. También se dice que las formas que contienen el AAS micronizado son más tolerables que las formas cristalinas de más de 100 μm .

IV.4. Sustancias protectoras.

Como ya hemos indicado anteriormente el efecto sistémico de inhibición de síntesis de prostaglandinas no se puede evitar mediante la modificación de la forma farmacéutica, ya que siempre que se administre AAS y se absorba, se producirá inhibición de la síntesis de prostaglandinas, lo que da lugar a un debilitamiento de las mucosas gástricas y origina una situación que favorece la aparición de lesiones gastrointestinales. Lo que si se puede hacer, y de hecho se lleva bastante tiempo estudiando en

animales de experimentación, e incluso en humanos, es la incorporación de otras sustancias en la formulación que puedan ser capaces de contrarrestar esa acción.

Entre las distintas sustancias protectoras de la irritabilidad gastrointestinal del AAS se encuentran (Ivey, 1988):

A. Medicamentos que reducen la acidez.

- Neutralizantes de secreciones ácidas: Antiácidos.

- Productos que inhiben la secreción:

- Antagonistas H_2 . Ej. : Cimetidina, ranitidina, famotidina.

- Anticolinérgicos selectivos: Pirenzepina.

- Derivados sustituidos del benzimidazol: Omeprazol.

B. Medicamentos que aumentan las defensas de las mucosas:

- Prostaglandinas y análogos. Ej. Misoprostol.

- Agentes neutralizantes de radicales libres.

Ej.: Guanilcisteina, butilhidroxitolueno, butilhidroxianisol,...

C. Otros:

- Derivados del ácido glicirretínico, aminoácidos,

Sucralfato, sales de selenio y litio, tiocianatos, α -bisabolol,.

El mecanismo protector de estas sustancias no está claro y en general, suelen actuar a distintos niveles. Normalmente se suelen clasificar en dos grandes grupos:

A. Sustancias con acción hiposecretora.

B. Sustancias con acción citoprotectora.

La inclusión en un grupo u otro es dudosa y puede depender no sólo de la sustancia sino también de la dosis. Por ejemplo, los bloqueantes H_2 a dosis altas estarían incluidos en el grupo A, mientras que a dosis muy bajas pueden tener acción citoprotectora.

A continuación se describen los distintos agentes con posible acción protectora.

IV.4.1. Antiácidos.

Producen un aumento del pH en el duodeno y estómago. Su utilidad en la úlcera gástrica es dudosa. Suelen utilizarse como complemento de otros fármacos antiulcerosos (CINIME y col., 1988). Se suelen clasificar en sistémicos o absorbibles (bicarbonato sódico) y no sistémicos o no absorbibles (hidróxido de magnesio, trisilicato de magnesio, fosfato e hidróxido de aluminio, carbonato cálcico, almagato y magaldrato).

Aunque en general se piensa que la acción protectora de estos productos se debe exclusivamente a su acción neutralizante se han sugerido acciones citoprotectoras para el magaldrato, quizá debido a un aumento en las secreciones de mucus en el estómago (Borella y col., 1989).

IV.4.2. Antagonistas de receptores H_2 .

Estas sustancias (cimetidina, ranitidina,...) disminuyen las secreciones ácidas en el aparato gastrointestinal por lo que se las puede

considerar como protectoras. Estos productos son eficaces a dosis hiposecretoras (Bauer y col., 1986) (Cavanagh y col., 1987) (Kimney y Silverstein, 1988) aunque existen trabajos en los que también se demuestra su eficacia a dosis más pequeñas por lo que podrían tener actividad citoprotectora (Katz y Shriver, 1989).

En comparación con las prostaglandinas los antagonistas H_2 parecen tener menor eficacia como agentes protectores que las prostaglandinas (Bauer y col., 1986) (Katz y col., 1987) (Katz y Shriver, 1989), aunque existen otros autores que opinan lo contrario (Hogan, 1988). En cualquier caso parecen tener menores efectos secundarios por lo que a diferencia de las prostaglandinas, si se encuentran registrados y comercializados.

IV.4.3. Anticolinérgicos selectivos: Pirenzepina.

Es un anticolinérgico de tipo muscarínico que aparentemente actúa únicamente a nivel de los receptores de la mucosa gástrica (M_1). Inhibe la acidez gástrica y las secreciones de pepsina. Es una alternativa a los antagonistas H_2 , aunque con reacciones adversas más frecuentes que estos (Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios y Coordinación de Prestaciones Farmacéuticas de la Secretaría General del INSALUD, 1988).

IV.4.4. Derivados sustituidos del benzimidazol: Omeprazol.

Es el agente inhibidor de secreciones ácidas más potente que se conoce, y puede que tenga también actividad citoprotectora como resultado de su acción en grupos sulfidrilos (Ivey, 1988).

IV.4.5. Prostaglandinas y análogos.

Son quizás de los más estudiados y tienen una gran eficacia como agentes protectores, aunque aún hay pocos ensayos clínicos en los que hayan demostrado su eficacia y seguridad (Ivey, 1988).

El efecto protector parece estar relacionado con la circulación sanguínea en la mucosa gástrica y posiblemente con la innervación del aparato gastrointestinal (Henegan y col., 1989).

Posiblemente uno de los agentes más estudiados es el misoprostol, análogo sintético de PGE_1 . El misoprostol tiene acción antisecretora, aunque también tiene actividad citoprotectora (Bauer, 1985) (Silverstein y col. 1976 y 1987).

Otros productos utilizados son PGE_2 (Arbacet) y análogos de síntesis de PGE_1 (Rioprostil). La eficacia de estos productos varía según los autores (Jaszewski y Crane, 1987) (Katz y col., 1987) (Katz y Shriver, 1989).

IV.4.6. Restauradores de la barrera hidrofóbica epitelial.

Suspensiones de lípidos como: dipalmitoil fosfatidilcolina y tripalmitina, en proporciones 1:4 son agentes protectores de mucosa gástrica (Lichtenberger y col., 1990). Su acción no está relacionada con el vaciamiento gástrico, ni con la estimulación y producción de prostaglandinas endógenas. Se piensa que su acción se debe a la restauración y al mantenimiento del carácter hidrofóbico de la membrana gástrica. Esta membrana pierde su carácter hidrofóbico cuando está en contacto con agentes irritantes, como AAS, y mediante la utilización de lípidos neutros y de carácter polar recupera su estado normal.

IV.4.7. Agentes neutralizadores de radicales libres.

Como ya se ha indicado anteriormente la disminución de prostaglandinas produce vasoconstricción, disminuye el riego sanguíneo en la mucosa gástrica y se producen isquemias. Si estas mucosas están además expuestas a agentes irritantes gástricos se pueden producir lesiones (Kaffman, 1989).

Sustancias donadoras de grupos sulfidrilos, como cisteamina, cisteína y metionina, tienen actividad como agentes protectores (Szabo y col., 1981) (Salim, 1987). Su eficacia es parecida a la de las prostaglandinas y su

acción parece ser de tipo citoprotectora (Laudanno, 1987).

Otras sustancias de tipo antioxidante como: superóxido dismutasa, catalasa, galato de propilo, benzoato sódico, butil-hidroxitolueno, ácido ascórbico y manitol demostraron tener acción protectora (Pihan y col., 1987) y su eficacia está relacionada con la neutralización de radicales libres.

IV.4.8. Otras sustancias.

Derivados del ácido glicerritínico, como la carbenoxolona, son eficaces en la reducción de las lesiones gástricas producidas por AAS y ácidos biliares. Su mecanismo de acción parece ser de tipo citoprotector puesto que no modifican las secreciones (Morgan y col., 1983) (Hossenbouns y Colin-Jones, 1974) (Tolstikov y col., 1990).

El sucralfato favorece la regeneración de la mucosa gástrica. Su acción parece estar relacionada con la estimulación de la producción de prostaglandinas endógenas (Danesh y col., 1988) (Stern y col., 1987), aunque su eficacia como agente protector parece ser inferior a la de la administración de cimetidina y prostaglandinas de síntesis (misoprostol).

Aminoácidos, especialmente la glicina y los de carácter básico, son

capaces de disminuir la toxicidad gástrica del AAS. Su mecanismo de acción parece deberse a la formación de un tampón en el estómago, por lo que se produce un efecto de neutralización, aunque también se ha sugerido una acción de bloqueo en el flujo de H^+ en la mucosa gástrica (Lim y col., 1979) (Okabe y col., 1976).

Las sales de litio y tiocianato sódico han demostrado ser agentes protectores eficaces incluso cuando se han administrado por vía parenteral y su acción puede ser debida a su actividad contra el stress y a la inhibición de secreciones gástricas (Whitehouse y Rainsford, 1983).

El selenito sódico es capaz de estimular la producción de prostaglandinas por lo que tiene actividad citoprotectora (Parmar y col., 1988).

El α -bisabolol es un aceite esencial de poca toxicidad extraído de la camomila. Este aceite tiene actividad antiinflamatoria y antipéptica (Isaac y Thiemer, 1975) (Jakovlev y Schlichtegroll, 1969), también se ha descrito su utilidad como antiulceroso (Szelenyi y col., 1979). Su acción posiblemente se deba a su capacidad de neutralizar radicales libres.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIAL Y METODOS

1. Reactivos e instrumental.

1.1. Reactivos empleados.

1.1.1. Calidad farmacopea.

- Acido acetilsalicílico.....Merck
- Acido salicílico.....Merck
- Derivados poliméricos del ac. metacrílico:
 - Eudragit^R E.....Rhom Pharma
 - Eudragit^R RL.....Rhom Pharma
 - Eudragit^R L.....Rhom Pharma
 - Eudragit^R RS.....Rhom Pharma
- Almidón de trigo.....Merck
- Manitol.....Merck
- Polivinil pirrolidona:
 - Kollindon^R K 25.....BASF
- Celulosa microcristalina:
 - Avicel^R PH 102.....FMC
- Almidón hidrolizado:
 - Celutab^RE.Mendell Co.Inc.
- Almidón de trigo.....Claudio Barcia
- Almidón de arroz.....Claudio Barcia

1.1.2. Calidad Análisis.

- Metanol Karl-Fisher.....Merck
- Metanol.....Merck
- Etanol absoluto.....Merck
- Alcohol isopropílico.....Panreac
- Acetona.....Panreac
- Cloruro sódico.....Merck
- Acetato de etilo.....Merck
- Nitrato férrico.....Probus
- Cloruro mercuríco.....Probus
- Clohídrico 1 N.....Panreac

1.1.3. Soluciones tampón utilizadas.

USP XXII, NF XVII, 1990:

- Solución acuosa ácida H Cl 0,1N
- Tampón ácido clohídrico pH 1,4
- Tampón ácido ortofosfórico pH 3,5
- Tampón ácido ftálico pH 3,5
- Tampón Ftalato neutralizado pH 4,4
- Tampón acetato pH 4,5
- Tampón fosfato pH 6,8
- Tampón borato pH 10,0

B.P. 1988:

- Tampón de glicina pH 11,1

1.1.4. Especialidades farmacéuticas.

- Aspirina^RBayer
- Adiro^RBayer
- Rhonal^RRhone Poulenc Farma-Rorer
- Trombolyt^RMadaus

1.2. Instrumental.

- Espectrofotómetro Beckman DU-6
- Fluorímetro Perkin- Elmer 204
- Cromatógrafo de líquidos (HPLC) Hewlett-Packard
HP 1084
- Bombo y equipo de gragear Erweka
- Compresor E.M.E.M.E.S.A.
- Karl Fischer Processor, Methrom
- Balanza de precisión Sartorius
- Máquina de comprimir excéntrica Bonals
- Durómetro Erweka
- Prensa hidráulica y traductores piezoeléctricos
Mondel
- Aparato de disolución Turu-Grau
- Rotavapor Buchi

2. Métodos analíticos.

A continuación se describen las distintas técnicas analíticas utilizadas para analizar cuali- y cuantitativamente tanto el AAS, como su principal producto de degradación y metabolismo, el AS.

Técnicas cualitativas:

- Cromatografía en capa fina
- Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Técnicas cuantitativas:

- Espectrofotometría UV
- Espectrofotometría de segunda derivada
- Colorimetría
- Fluorimetría
- Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC).

En la tabla se muestran los métodos analíticos utilizados según el ensayo o estudio realizado.

ENSAYO O ESTUDIO	METODO DE DETERMINACION		SUSTANCIA A ANALIZAR
	SEPARATIVO	NO SEPARATIVO	
DISOLUCION		- Espectrofotometría UV	AAS
		- Espectrofotometría de punto isobéptico	AAS
ESTABILIDAD	- Cromatografía en capa fina		AAS y AS
	- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)		AAS y AS
	- Espectrofotometría de segunda derivada		AAS y AS
	- Fluorimetría		AS
SALICILATOS EN ORINA	- HPLC	- Colorimetría	AS

Tabla 1. Métodos de análisis a utilizar según el ensayo o estudio.

Análisis cualitativo.

2.1. Cromatografía en capa fina.

Esta técnica permite separar el AAS del AS. La identificación de cada uno de estos productos se realiza por los R_f característicos (utilizando patrones de referencia).

Método. Se utiliza el método descrito en Clarck's (1986) como sistema TF en el que se utilizan placas de silicagel DC-60, F-254, 20 x 20 cm (Merck). Como eluyente se utiliza acetato de etilo. Las placas se activan por calentamiento a 100°C durante 30 minutos. El volumen de muestra utilizado es de 4 μ l y el desarrollo es de 15 cm. La mancha se observa con luz ultravioleta (320 nm).

La cromatografía en capa fina se utilizó durante los ensayos de estabilidad.

2.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (cualitativo).

Esta técnica permite analizar cualitativa y cuantitativamente las distintas muestras.

Método. El método utilizado es una variante de los métodos descritos por Rumble y Roberts (1981), Das Gupta (1980), USP XXII (1990), Jimmo y col (1990) y Lampert y Stewart (1990).

Se emplea un cromatógrafo Hewlett-Packard HP 1084, con detector de

longitud de onda fija a 254 nm.

Fase estacionaria:

Columna C_{18} , 10 μ m de 200 x 4,6 mm (Hewlett-Packard ref. 799150 D-174).

Fase móvil:

- Flujo 1,5 ml/min

- Composición:

75% de tampón de ac. ortofosfórico pH 3,5 (ac. ortofosfórico 20mM/l y KOH c.s.p. pH 3,5).

25% metanol HPLC.

Volumen de inyección 40 μ l.

La figura 2 muestra el cromatograma característico de una mezcla de AAS y AS.

Preparación de muestras. Se disuelve en la fase móvil y se filtra (0,45 μ m) antes de inyectar.

En el análisis cualitativo se comprueba que el tiempo de retención coincide con el de las muestras patrones.

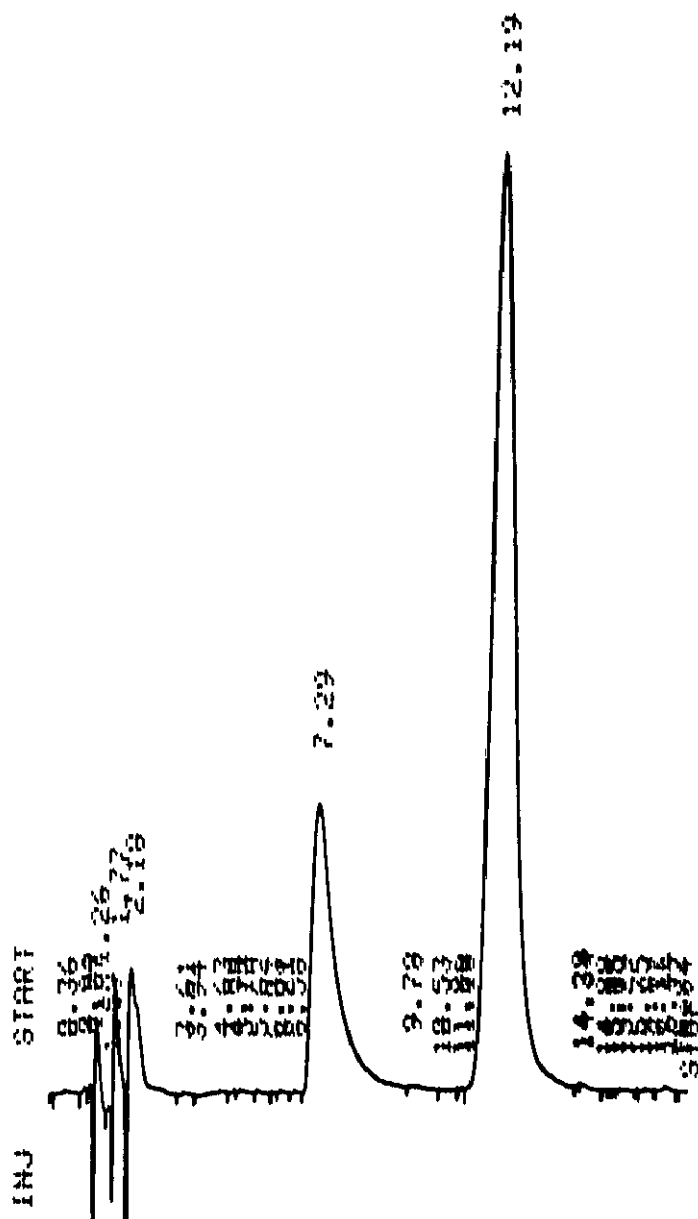


Figura 2. Cromatograma de una muestra de AAS y AS. Los tiempos de retención son 7,29 minutos para AS y 12,19 minutos para AAS.

Analisis cuantitativo.

2.3. Espectrofotometría ultravioleta.

Debido a que el AAS se degrada con facilidad a AS, La valoración directa por el método de espectrofotometría está condicionada por la posible interferencia que se produce en los espectros de absorción del AAS y del AS. La longitud de onda a la cual es mínima la interferencia del pH en la determinación del AAS es lo que se conoce como punto isosbético.

El valor del punto isosbético varía según el pH del medio (según pH, 265 ó 280 nm) (USP XXII, 1990). La figura 3 muestra el barrido de absorbancias.

Esta técnica analítica se realizó según las condiciones de la USP XXII, 1990, para la valoración de las muestras obtenidas en los ensayos de velocidad de disolución.

Las rectas de calibrado para los distintos pH fueron:

$$U.A. = A + B \times C \text{ (mg/ml)}$$

$$\text{A 265 nm: } U. A. = - 0.0285 + 2,954 \times C \text{ (mg/ml)}$$

$$r = 0.9999$$

$$\text{A 280 nm: } U. A. = - 0.0086 + 5,475 \times C \text{ (mg/ml)}$$

$$r = 0.9995$$

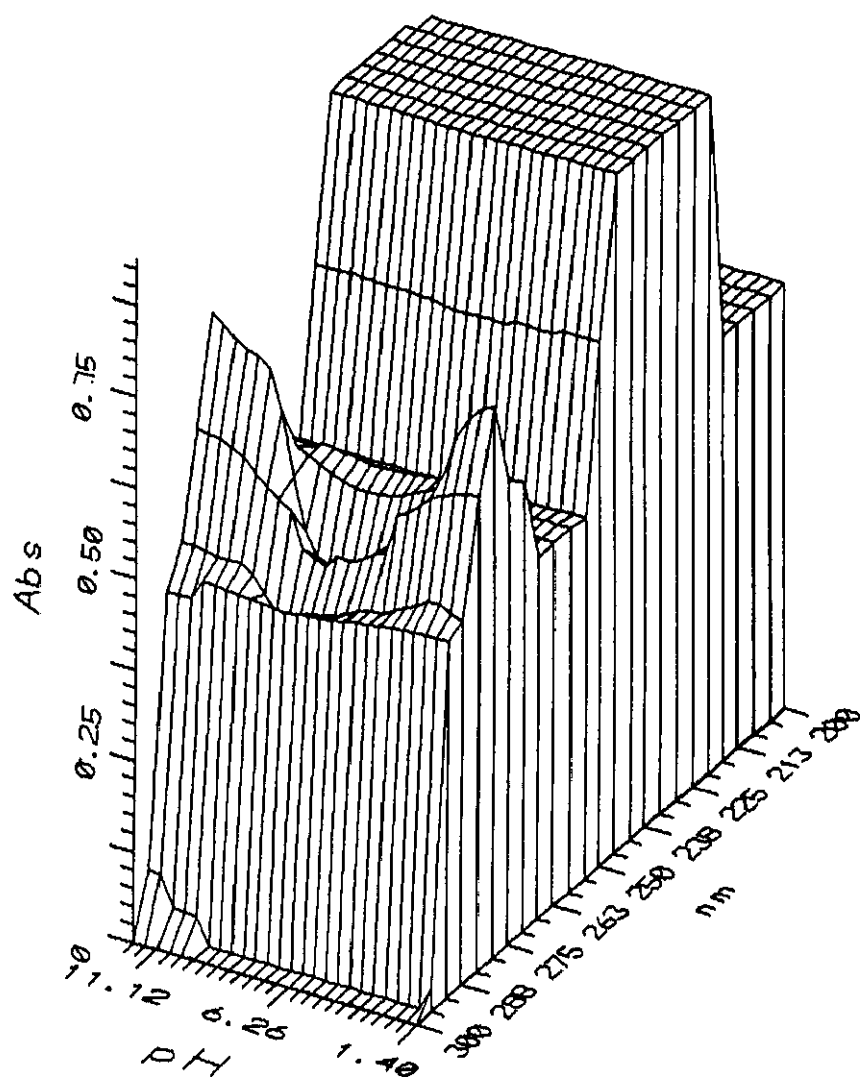


Figura 3. Barrido espectrofotométrico del AAS a distintos pH.

2.4. Espectrofotometría de segunda derivada.

Este método permite analizar de forma individualizada el AAS y el AS. Utilizamos una variante del método descrito por Mazzeo y col. (1982) y el de Kitamura y col. (1983).

Las condiciones del análisis fueron:

Span: 0,01

$\Delta \lambda$: 8 nm

Velocidad de barrido: 300 nm/min

Con los resultados de la segunda derivada del barrido espectrofotométrico (figura 4) se obtienen unos máximos a 298 y 326 nm que corresponden respectivamente al AAS y AS.

Estos valores son proporcionales a las concentraciones y cumplen la ley de Beer.

En nuestro caso utilizamos esta técnica para determinación de AS en los estudios de estabilidad. Los valores de amplitud de absorbancias (Span) para las distintas concentraciones de AS son:

$$\text{Span} = -9 + 1,765 \times C \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$r = 0,9992$$

$$\text{Span} = -6 + 0,960 \times C \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$r = 0,9943$$

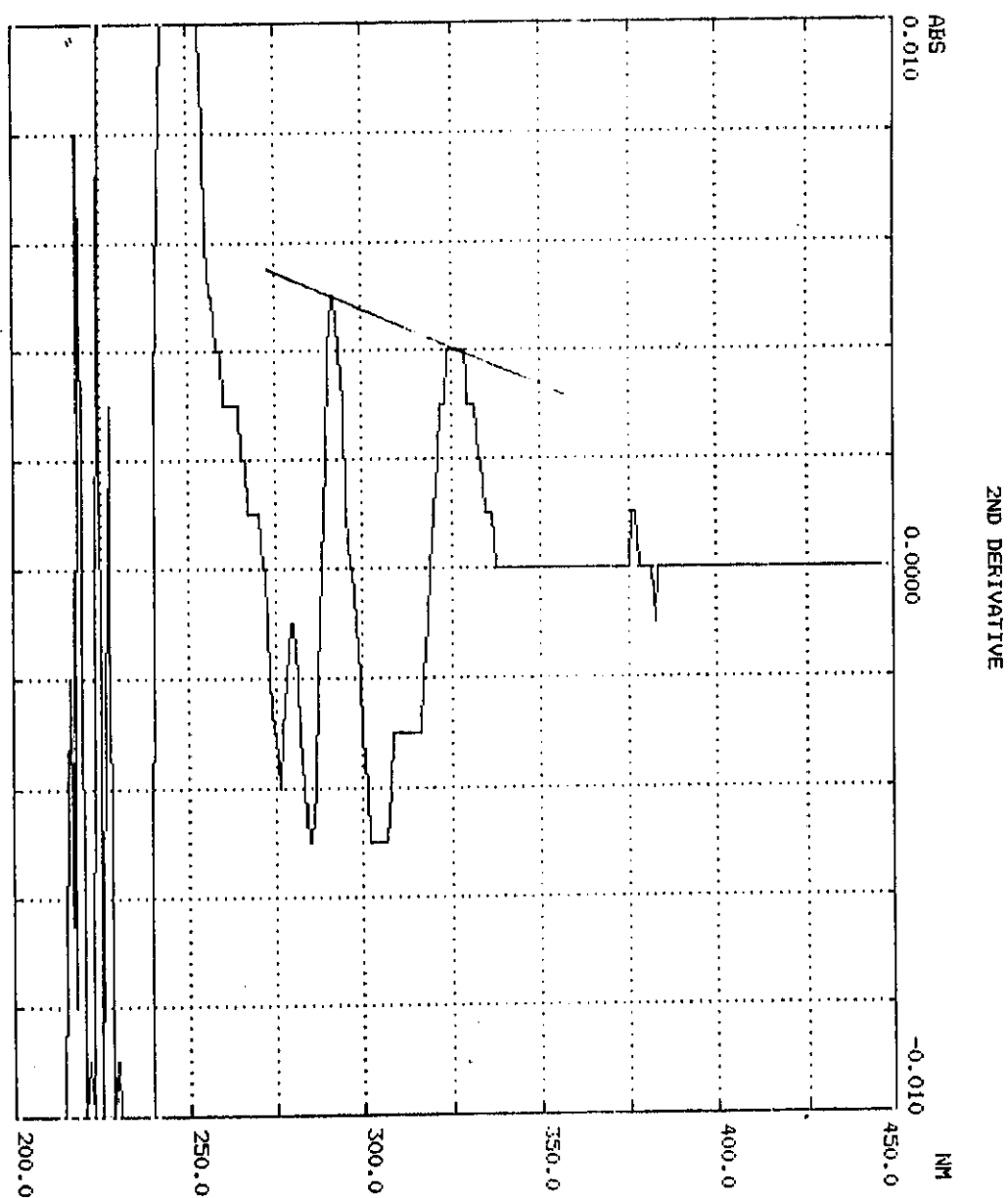


Figura 4. Segunda derivada del barrido espectrofotométrico de una muestra de AAS y AS.

2.5. Fluorimetría.

Mediante fluorimetría se pueden analizar las concentraciones de AS en distintas muestra.

El método utilizado es una variante del descrito por Veresh y col. (1971).

Las condiciones de análisis fueron:

sensibilidad: 6

selectividad: X_1

emisión: 410 nm

excitación: 305 nm

Las muestras se preparan haciendo diluciones en etanol absoluto.

La figura 5 muestra el barrido espectrofluorimétrico del AS en presencia de AAS. Los valores de concentración se relacionan con las unidades de fluorescencia (U.F.) según la siguiente ecuación:

$$U.F. = -0,63 + 0,0758 \times C (\mu g/ml)$$

$$r = 0,9847$$

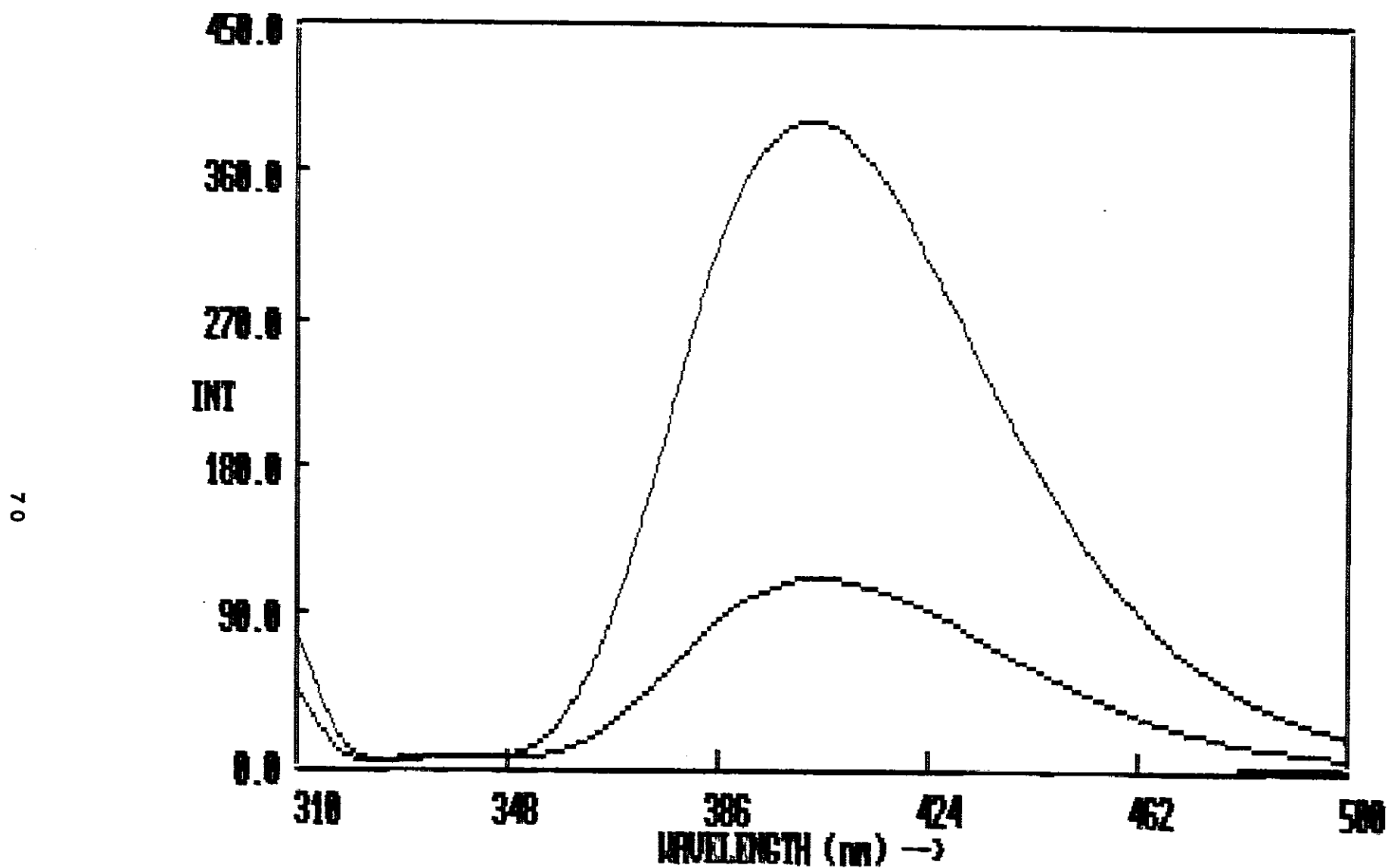


Figura 5. Barrido espectrofluorométrico del AS en presencia de AAS.

2.6. Colorimetría.

Se valoran las concentraciones de salicilatos en la muestra. Para ello se utiliza la técnica clásica de Trinder (1954), (Delacoux y col. 1970).

Los salicilatos forman un complejo coloreado por quelación con sales de hierro.

Técnica. El reactivo de Trinder tiene la siguiente composición:

- $\text{Fe} (\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$40 g
- Hg Cl_2 40 g
- $\text{CL H } 1\text{N}$120 ml
- Agua destilada.....c.s.p. 1000 ml

Se disuelve en baño maría el $\text{Cl}_2 \text{ Hg}$, se enfría y se añade ClH y nitrato férrico. Se puede conservar hasta 15 días a 5°C .

A 0,5 ml de muestra se le añade 5 ml de reactivo de Trinder, se agita 10 minutos para precipitar proteínas y se valora a continuación. El producto obtenido presenta un espectro de absorbancia que se puede ver en la figura 6.

Los valores de absorbancia a 540 nm se relacionan con las concentraciones de AS mediante la siguiente ecuación:

$$\text{U.A.} = 0,0026 + 10,75 \times C \text{ (mg/ml)}$$

Este valor obtenido es el de salicilatos libres, cuando se quieren evaluar los salicilatos totales hay que hidrolizar previamente, lo que se consigue al calentar las muestras durante 1 hora a 100°C. Los valores de absorbancia a 540 nm se relacionan con concentraciones de AS mediante la ecuación:

$$U.A. = 0,01 + 10,075 \times C \text{ (mg/ml)}$$

El método de Trinder se utilizó para la determinación de salicilato en orina, durante los estudios de biodisponibilidad.

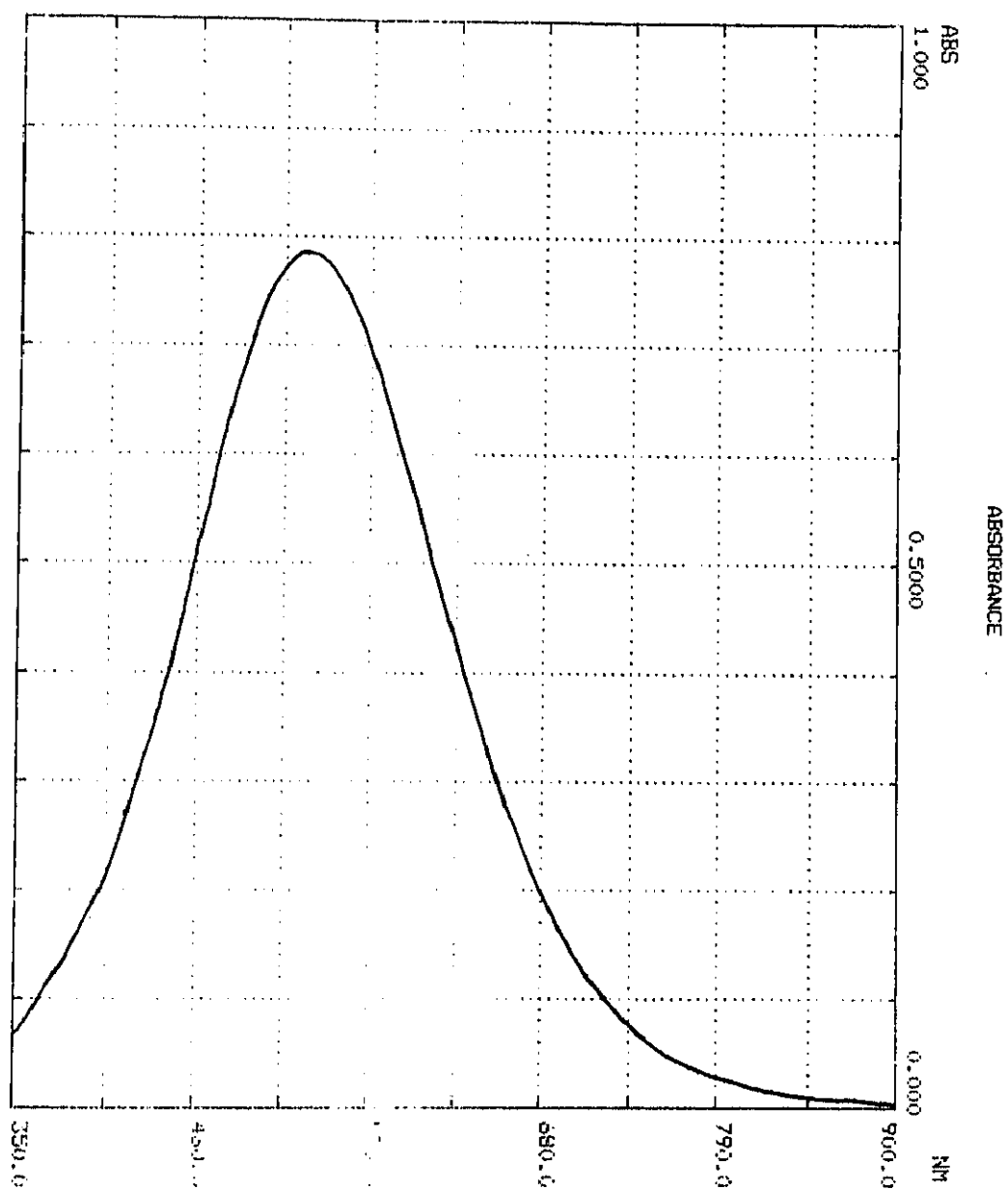


Figura 6. Barrido de absorbancia del complejo formado por sales de hierro y salicilato (Trinder).

2.7. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (cuantitativa).

Este método ya ha sido descrito anteriormente (apartado 2.2.). Para la cuantificación se relacionan el valor de áreas bajo la curva (mAU) de los picos obtenidos a los distintos tiempos (ver figura 7):

AS:

$$\text{mAU} = -12,5 + 9,9 \times C \text{ (}\mu\text{g/ml)}$$

$$r = 0,9968$$

AAS:

$$\text{mAU} = 19,01 + 902,9 \times C \text{ (mg/ml)}$$

$$r = 0,9985$$

2.8. Validación.

Debido a que el método analítico de segunda derivada es relativamente nuevo, y no existe experiencia en el departamento con este método, se procedió a la validación del mismo. Para lo cual se comparó con el método de HPLC y de cromatografía en capa fina.

En la validación se comprueba la linealidad, exactitud, precisión y especificidad.

Linealidad. Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionables a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado. En la recta $y = a + b x$, b es la pendiente. A mayor pendiente, mayor sensibilidad (respuesta del método frente a los cambios de concentración del analito).

La varianza de la pendiente s_b^2 se utiliza como expresión matemática de la linealidad. A menor varianza mejor linealidad. Se determina con una de las fórmulas siguientes:

$$s_b^2 = \frac{(S_{y,x})^2}{(x - \bar{x})^2}$$

Se calcula la desviación $(S\sqrt{s_b^2})$, y la desviación estándar relativa (s_b rel %).

$$S_b \text{ rel } (\%) = \frac{S_b}{b} \cdot 100$$

El valor de $S_b \text{ rel } (\%)$ debe estar comprendido entre 2 y 5 %.

Los límites de confianza de la pendiente se hallan a partir de la expresión:

$$b \pm t S_b$$

Siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $p = 0,05$).

El error sistemático del método se calcula mediante el valor de a , intersección con el eje de ordenadas (m ordenada en el origen). En el caso ideal debe ser cero.

La varianza del término independiente se deduce en la fórmula siguiente:

$$S_a^2 = \frac{S_{y,x}^2}{\sum (x - \bar{x})^2} \times \frac{\sum x^2}{n}$$

Se calcula la desviación (S_a)

$$S_a = \sqrt{(S_a^2)}$$

Los límites de confianza del término independiente son:

$$a \pm t S_a$$

Siendo t el valor de la distribución de Student para $n-2$ grados de libertad a la probabilidad escogida (generalmente $p = 0,05$). Si estos límites incluyen el cero, se cumple la condición de proporcionalidad.

Exactitud y precisión.

Se determina mediante una concentración única de analito, comparando dos métodos analíticos.

Se parte de una muestra homogénea que se analiza repetidas veces ($n > 6$) por los dos métodos analíticos.

Para cada serie se halla la varianza y la desviación estándar. Un test de F de Snedecor de razón de varianzas indicará si existen diferencias significativas entre las precisiones de ambos métodos.

$$F_{\text{exp}} = \frac{S_a^2}{S_b^2}$$

F_{tablas} (según grados de libertad $(n-1)$ y $p = 0,1$)

Si $F_{\text{exp}} < F_{\text{tablas}}$ ambos métodos tienen una precisión semejante.

En el caso de que las precisiones sean semejantes se aplicará un test

t a la diferencia entre las medias de las dos series. Este test nos indica si estas medias difieren o no significativamente en el grado de probabilidad escogido.

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_a - \bar{x}_b|}{\sqrt{\frac{s^2}{n_a} + \frac{s^2}{n_b}}}$$

$$s^2 = \frac{(n_a - 1) S_a^2 + (n_b - 1) S_b^2}{(n_a - 1) + (n_b - 1)}$$

$$t_{\text{tablas}} [p = 0,05; \text{Grados de libertad} = (n_a - 1) + (n_b - 1)]$$

Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ los métodos no difieren con una probabilidad superior al 95 %.

Especificidad.

Capacidad de detectar el analito sin interferencias de ningún otro compuesto. Se utilizan los métodos separativos (cromatografía) para determinar si existen otros productos que puedan interferir. En nuestro caso comprobamos la especificidad del análisis de muestras de estabilidad por espectrofotometría de segunda derivada y se comprueba por cromatografía en capa fina y HPLC que no existe ninguna otra sustancia que pueda interferir en el análisis.

3. Formulaciones.

A lo largo del desarrollo experimental de esta tesis se prepararon distintas formulaciones de AAS. Según sus características y proceso tecnológico de fabricación se dividen las formulaciones en los siguientes grupos:

- Pelets
- Granulados
- Dispersiones sólidas
- Comprimidos:
 - Comprimidos convencionales
 - Comprimidos de acción sostenida

En la tabla 2 se enumeran las formulaciones realizadas y su número clave. En las tablas 3 y 4 se describen las fórmulas cuantitativas de cada formulación.

3.1. Proceso de fabricación y composición cuantitativa.

Tanto en pelets, granulados y dispersiones sólidas se utiliza como materia prima AAS con un tamaño de partícula comprendida entre 50 y 200 μm , mientras que en el caso de los comprimidos si no se especifica otra cosa se utiliza AAS de tamaño comprendido entre 400 y 500 μm .

Formulación.	Clave.
- Pelets	
- AAS + Eudragit E (10%)*.....	P1
- AAS + Eudragit E (13 %).....	P2
- AAS + Eudragit E (10%) + almidón (10%).....	P3
- AAS + Eudragit L (13%).....	P4
- AAS + Eudragit RL (13%).....	P5
- AAS + Eudrgit RS (5%).....	P6
- AAS + Eudragit RS (10%).....	P7
- AAS + Eudragit RS (13%).....	P8
- AAS + Eudragit RS (15%).....	P9
- AAS + Eudragit RS (20%).....	P10
- Granulado	
- AAS.....	G1
- Dispersiones sólidas	
- AAS + manitol (25%).....	DS1
- AAS + PVP (25%).....	DS2
- Comprimidos convencionales	
- AAS + Avicel PH102 (60%).....	C1
- AAS + Avicel PH102 (13%).....	C2
- Aspirina (Bayer).....	C3

(continua en la página siguiente)

* Los porcentajes se expresan en peso/peso.

- Cesión sostenida

- AAS.....	C4
- AAS + P1 (100%).....	C5
- AAS + P10 (25%).....	C6
- AAS + P10 (50%).....	C7
- AAS + P10 (75%).....	C8
- AAS (15%) + P10 (60%) + Avicel (25%).....	C9
- P10 (100%).....	C10
- P10 + Avicel PH 102 (5%).....	C11
- P10 + Avicel PH 102 (10%).....	C12
- P10 + Avicel PH 102 (15%).....	C13
- P8 + Avicel PH 102 (20%).....	C14
- P10 + Avicel PH 102 (25%).....	C15
- P10 + Almidón de trigo (3%).....	C16
- P10 + Almidón de trigo (10%).....	C17
- P10 + Almidón de trigo (15%).....	C18
- P10 + Almidón de trigo (25%).....	C19
- P10 + Celutab (5%).....	C20
- P10 + Celutab (10%).....	C21
- P10 + Celutab (15%).....	C22
- P10 + Celutab (25%).....	C23
- P3.....	C24
- P3 + Avicel PH 102 (60%).....	C25
- Rhonal (Rhone-Poulenc).....	C26
- Adiro (Bayer).....	C27
- Tromalyt (Madaus).....	CAP1

Tabla 2. Composición cualitativa y clave asignada de las distintas formulaciones.

- Pelets.

Se definen los pelets "como unas partículas esféricas o casi esféricas, generalmente recubiertas, de tamaño comprendido entre 0,5 y 1,5 mm, obtenidas por agregación de materiales finamente divididos y con buenas propiedades reológicas" (Ghebre-Sellesie, 1989) (Real Academia, 1990).

En nuestro caso el proceso de fabricación de los pelets ha sido siempre el mismo. Se utiliza AAS pulverizado ($50 < \phi < 200 \mu\text{m}$), que se humecta en una paila de grageado mediante pulverización con una solución de Eudragit E (10%) en etanol. Se obtienen así unas partículas esféricas de tamaño comprendido entre 400-500 μm , tamaño similar a los utilizados por Rao y col (1989). Posteriormente y según la formulación se recubre o no con otros materiales.

En la tabla 3 se muestra la composición cuantitativa y características específicas de cada formulación.

- Granulado.

Se realiza un granulado convencional (formulación G1) en el que únicamente se utiliza etanol absoluto y AAS. El tamaño final de los gránulos está comprendido entre 400 y 500 μm .

- Dispersión sólida.

El proceso de fabricación se basa en la disolución del AAS en una

solución de etanol absoluto con manitol (formulación DS1) o PVP (formulación DS2), ambos al 25% p/p. Al calentar estas soluciones en un baño a 40°C bajo vacío (Rotavapor Buchi) se elimina el etanol y en la dispersión sólida obtenida se selecciona una fracción de tamaño comprendido entre 400 y 500 μm .

- Comprimidos.

Se pesan los distintos componentes de la formulación, se mezclan y se comprimen en una máquina excéntrica Bonals con punzones de 13,6 mm de diámetro. La composición cuantitativa de cada formulación se detalla en la tabla 4.

FORMULACION	AAS	EUDRAGIT				ALMIDON DE TRIGO	OBSERVACIONES
		E	L	RL	RS		
P1	90	10	*	*	*	*	*
P2	87	13	*	*	*	*	*
P3	80	10	*	*	*	10	El almidón se mezcla con el AAS y luego se humecta la mezcla.
P4	77	10	13	*	*	*	
P5	77	10	*	13	*	*	*
P6	85	10	*	*	5	*	*
P7	80	10	*	*	10	*	*
P8	78	10	*	*	13	*	*
P9	75	10	*	*	15	*	*
P10	70	10	*	*	20	*	*

Tabla 3. Composición cuantitativa en porcentaje y características específicas de cada formulación de pelets.

CLAVE	AAS	FORMULACION DE PELETS	AVICEL PH 102	ALMIDON DE TRIGO	CELUTAB	EXPLOTAB	OBSERVACIONES
C1	40	*	60	*	*	*	*
C2	77	*	18	*	*	5	*
C3	*	*	*	*	*	*	Especialidad farmacéutica Aspirina (Bayer) lote D-7-1
C4	100	*	*	*	*	*	*
C5	*	P1 (100%)	*	*	*	*	*
C6	75	P10 (25%)	*	*	*	*	*
C7	50	P10 (50%)	*	*	*	*	*
C8	25	P10 (75%)	*	*	*	*	*

Tabla 4. Composición cuantitativa en porcentaje (p/p) y características específicas de cada formulación.

CLAVE	AAS	FORMULACION DE PELETS	AVICEL PH 102	ALMIDON DE TRIGO	CELUTAB	EXPLATAB	OBSERVACIONES
C9	15	P10 (60%)	25	*	*	*	*
C10		P10 (100%)	*	*	*	*	*
C11		P10 (95%)	5	*	*	*	*
C12		P10 (90%)	10	*	*	*	*
C13		P10 (85%)	15	*	*	*	*
C14		P10 (80%)	20	*	*	*	*
C15		P10 (75%)	25	*	*	*	*
C16		P10 (97%)	*	3	*	*	*

Tabla 4 (continuación). Composición cuantitativa en porcentaje (p/p) y características específicas de cada formulación.

CLAVE	AAS	FORMULACION DE PELETS	AVICEL PH 102	ALMIDON DE TRIGO	CELUTAB	EXPLOTAB	OBSERVACIONES
C17	*	P10 (90%)	*	10	*	*	*
C18	*	P10 (85%)	*	15	*	*	*
C19	*	P10 (75%)	*	25	*	*	*
C20	*	P10 (95%)	*	*	5	*	*
C21	*	P10 (90%)	*	*	10	*	*
C22	*	P10 (85%)	*	*	15	*	*
C23	*	P10 (75%)	*	*	25	*	*
C24	*	P4 (100%)	*	*	*	*	*

Tabla 4 (continuación). Composición cuantitativa en porcentaje (p/p) y características específicas de cada formulación.

CLAVE	AAS	FORMULACION DE PELETS	AVICEL PH 102	ALMIDON DE TRIGO	CELUTAB	EXPLOTAB	OBSERVACIONES
C25	*	P4 (75%)	25	*	*	*	*
C26	*	*	*	*	*	*	Especialidad farmacéutica Rhonel (Rhône-Poulenc) lote D-6
C27	*	*	*	*	*	*	Especialidad farmacéutica Adiro (Bayer) lote D-7
CAP1	*	*	*	*	*	*	Especialidad farmacéutica Tromalyt (Madaus) lote D-3

Tabla 4 (continuación). Composición cuantitativa en porcentaje (p/p) y características de cada formulación.

3.1. Estudio físico de compresión de distintas formulaciones de AAS.

En este apartado se estudian las características de compresión del AAS. Estas características pueden modificarse cuando se utilizan polímeros de recubrimiento.

Para estudiar las características de compresibilidad se suelen utilizar gráficas en las que se representan: fuerzas de compresión con respecto a desplazamiento del punzón y fuerzas de compresión con respecto al tiempo que dura el ciclo de compresión (Krycet y col, 1982) (Lenenberger y Rohere, 1986) (Amstrong, 1989) (Hoblitzelt y Rhodes, 1990a y 1990b). Estos métodos se utilizan para relacionar la física de la compresión con otros parámetros estadísticos como: densidad, tiempo de digregación, resistencia a la fractura, porosidad y superficie específica; así como con parámetros dinámicos como: energía y distribución de presión en la matriz (Parrot, 1981). Otros factores estudiados han sido tamaño de partícula, naturaleza elástica, plástica o fragmentable del producto a comprimir (Roberts y Rowe, 1987), forma de partícula (Wong y Pipel, 1990) e influencia del método de granulación (Ragnarsson y Sjögren, 1982).

En nuestro caso se estudia el efecto del recubrimiento en las características de compresión del AAS.

Características de prensa hidráulica.

Se utiliza un modelo experimental de prensa hidráulica diseñada en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid (Lopez, 1989) (Rojano, 1989). Esta prensa hidráulica tiene unos transductores de presión y desplazamiento que se encuentran conectados a un convertidor de señales (análogo/digital) y un amplificador. Todo ello controlado por un ordenador que funciona con un programa diseñado en el Departamento.

La matriz y punzones tienen un diámetro de 14 mm.

Formulaciones estudiadas.

Se estudian las características de las siguientes formulaciones*:

- Formulación C4, está formada por cristales de AAS.
- Formulación C5, está constituida por pelets de AAS.

(*) Aunque la composición es la misma que en las tablas 3 y 4 se modifican las cantidades totales utilizadas por trabajar siempre con un volumen de matriz constante.

- Formulación C10, está formada por pelets de AAS recubiertos con un 20% de Eudragit RS.

- Formulación C14, está constituida por una mezcla de pelets de AAS recubiertos con Eudragit RS y Avicel PH 102.

Parámetros de compresión.

Se determinan las siguientes características de compresibilidad:

- Recuperación elástica (R.E.). Se utiliza el criterio de Wong y Pipel (1990).

$$R.E. (\%) = \frac{H_f - H_i}{H_i} \times 100$$

Donde H_f es la altura final del comprimido y H_i es la altura del comprimido cuando el punzón superior ha alcanzado el desplazamiento máximo.

- Eficacia lubricante (E.L.). LA eficacia lubricante se puede expresar cuantitativamente como la relación entre la fuerza máxima que se registra en el punzón inferior (FMPI) y la fuerza máxima del punzón superior (FMPS).

$$E.L. = \frac{FMPI}{FMPS}$$

3.3. Características y ensayos farmacotécnicos de las distintas formulaciones realizadas.

-Tamaño de partícula. Se relaciona mediante tamices de acero inoxidable de distinta luz de malla.

-Peso de comprimidos. Se pesan exactamente y por separado 10 comprimidos. Se calcula el peso medio y la desviación estándar relativa (USP XXII, 1990).

-Uniformidad de contenido. Se pesan por separado 10 comprimidos y se calcula el peso medio y la desviación estándar. El peso de cada comprimido debe estar comprendido entre el 85 y el 115% y la desviación estándar relativa debe ser igual o menor al 6%. Si uno de los comprimidos está fuera del margen 85-115%, pero ninguno fuera del 75-125%, o si la desviación estándar es menor del 6%, se pesan otros 20 comprimidos. Sólo uno de los 30 comprimidos pesados puede estar fuera del margen 85-115% y ninguno fuera del 75-125%. La desviación estándar relativa de las 30 dosis no debe exceder del 7,8%.

- Contenido en AAS. Se toman 10 comprimidos que se machacan en un mortero hasta polvo impalpable. A continuación se realizan las diluciones oportunas en etanol absoluto, se filtra y se valora por espectrofotometría de segunda derivada. Los valores de contenido deben estar entre 90-110% del teórico en comprimidos convencionales y entre 95-105% en los de cesión prolongada (USP XXII, 1990).

- Contenido en AS libre. Se pulverizan 10 comprimidos en un mortero y posteriormente se realizan las diluciones oportunas, en etanol absoluto, se filtra y se valora por espectrofotometría de segunda derivada. Los límites permitidos en comprimidos convencionales es de un 0,3% y en los de cesión prolongada del 3%.

- Ensayo de disolución.

- Formulaciones convencionales (cesión rápida). Se utiliza el aparato I de la USP XXII (1990) a 50 rpm utilizando 500 ml de tampón acetato pH 4,5. El tiempo mínimo de ensayo es de 30 minutos. El análisis después de filtrar (diluir en el mismo tampón) se realiza por espectrofotometría directa en el punto isosbético ($\lambda = 265$ nm). Los valores de tolerancia son de un 80% disuelto en menos de 30 minutos.

- Formulaciones de cesión sostenida. se sigue un criterio de la USP XXII (1990). Se emplea el aparato I a 100 rpm. Como líquido de ataque se usan 900 ml de tampón fosfato pH 6,8. El análisis después de filtrar y diluir en H CL 0,1N se realiza por espectrofotometría directa en el punto isosbético ($\lambda = 265$ nm).

- Formulaciones de cesión prolongada. Se usa el aparato I de la USP XXII (1990) a 100 rpm. Como líquido de ataque se usan 750 ml de clorhídrico 0,1 N. A las dos horas se añaden 250 ml de tampón fosfato (pH 6,8). Se toman muestras a distintos tiempos, se filtran, se diluyen y se

analizan por espectrofotometría directa $\lambda = 280 \text{ nm}$, en medio ácido y $\lambda = 265 \text{ nm}$, en tampón pH 6,8.

Los valores de las gráficas son media de seis determinaciones.

De las gráficas acumuladas de porcentaje disuelto a distintos tiempos se determina el tiempo a que se cede y disuelve el 50 y el 80% (TD50 y TD80 respectivamente). En los comprimidos convencionales se determina el porcentaje disuelto a los 30 minutos (%D30).

- Cálculo de la degradación del AAS durante los estudios de disolución.

En los estudios de disolución, además del error propio del método analítico, existirá un error debido al proceso de degradación del AAS a AS. Este error será diferente en función de las condiciones del ensayo de disolución empleado en cada caso.

La determinación de los valores de AS en presencia de AAS se determina mediante el método de segunda derivada, método validado con el de HPLC.

En formulaciones convencionales, el error producido durante su lectura a 265 nm, en un medio tampón acetato pH 4,5 y para un tiempo de 30 minutos es de 5,68%, con una degradación de 1,15% en AS.

En las formulaciones de cesión sostenida, el error producido para una lectura a 265 nm, tras diluir en un medio tampón fosfato pH 6,8 y para un tiempo de 8 horas, es de 5,89% con una degradación de 18,53% en AS.

En formulaciones de cesión prolongada, el error producido en las

lecturas a 280 nm, empleando como medio de ataque ácido clorhídrico 0,1N y para un tiempo de 2 horas, es de 5,32%, presentando una degradación de un 2,26% de AS. A continuación y tras variar el medio de ataque a un tampón fosfato pH 6,8 , se continua el análisis a 265 nm durante seis horas más, presentando un error global en el análisis de este tipo de formulaciones de un 5,42%, con una degradación del 15,99% en AS.

En conclusión observamos que el error durante el ensayo de disolución está comprendido entre un 5,3-6,0%, valores que podemos considerar como bajos si tenemos en cuenta que se llegan a producir degradaciones de hasta un 18,5% en AS. La existencia de un error tan bajo, frente a estos valores de degradación tan altos se debe a que los coeficientes de extinción para el AAS y el AS en las mismas condiciones de análisis son muy próximos, el valor ligeramente superior del coeficiente de extinción del AS se ve compensado parcialmente debido a que durante el proceso de hidrólisis, de 100 partes de AAS se obtienen 76,67 partes de AS.

COEFICIENTES DE EXTINCION

pH 6,8	pH 1,4
AAS(280 nm)=182	AAS(280 nm)=205
AAS (265 nm)=204	AAS(265 nm)=260
AS (280 nm)=195	AS (280 nm)=195
AS(265 nm)=257	AS (265 nm)=319

- Resistencia a la fractura. Se estudia la resistencia a la fractura de 5 comprimidos. Se determina el valor medio y la desviación estandard, los valores se expresan en unidades Erweka (U.E.).

4. Estabilidad.

Introducción.

En los estudios de estabilidad del AAS, tanto en materia prima como en producto terminado se determina el porcentaje de AS libre.

En los estudios de estabilidad todas las formulaciones fueron conservadas a temperatura constante de 25°C.

Condiciones del estudio de estabilidad. (Verain, 1987) (Cartwright, 1987).

Temperatura: 25°C.

Humedad relativa: No controlada (humedad ambiente).

Presentación de muestras: Se encuentran en tubos de vidrio sin cierre.

Duración del estudio y tiempo de toma de muestra: La duración total es de 21 meses y las muestras se analizan a 0, 1, 3, 6, 9, 16 y 21 meses.

Muestras y periodo de validez: Las formulaciones estudiadas y su periodo de validez, expresado como porcentaje máximo de AS permitido por

la USP XXII (1990) se muestran en la tabla 5.

Técnica analítica: Se determina la riqueza en AAS y AS mediante espectrofotometría de segunda derivada (ver técnicas analíticas). En todos los casos se analizan las muestras por triplicado.

Orden de reacción: La cinética de la reacción de hidrólisis y degradación del AAS se puede ajustar a una cinética de orden cero o de orden uno.

$$\text{Orden cero: } AS_t = AS_0 + Kt$$

$$\text{Orden uno: } \ln AS_t = \ln AS_0 + K't$$

Donde,

AS_t = porcentaje de AS a tiempo t

AS_0 = porcentaje de AS inicial

K = constante de reacción de orden cero

K' = constante de reacción de orden uno

t = tiempo

FORMULACION	% MAXIMO DE AS-LIBRE PERMITIDO
-------------	-----------------------------------

Materias primas

AAS-Materia prima.....0,1%

Productos intermedios

Pellets de AAS (P10)

(Eudragit RS) 13%.....3%

Pellets de AAS (P4)

(Eudragit L) 13%.....3%

Dispersión sólida (DS2)

AAS: PVP (75:25).....3%

Producto terminado

(comprimidos)

Pelets AAS (C10)

(Eudragit RS) 20%.....3%

Tabla 5. Porcentaje máximo de AS-libre permitido para las distintas formulaciones sometidas a un estudio de estabilidad a humedad relativa ambiente.

Si comparamos los coeficientes de correlación (r) para orden cero (r_0) y uno (r_1) en la cinética de degradación de cada formulación se observa si existe o no una diferencia significativa. Esto se determina por los valores del estadístico Z y su desviación tipo (S_z) permitiendonos determinar el orden de la reacción que más se ajusta en aquellos casos que sea posible mediante un test "t" de Student (Franquesa, 1985).

$$Z_0 = \frac{1}{2} [\ln (1 + r_0) - \ln (1 - r_0)] \quad \text{Ec. 1}$$

$$Z_1 = \frac{1}{2} [\ln (1 + r_1) - \ln (1 - r_1)] \quad \text{Ec. 2}$$

$$S_z = \frac{1}{\sqrt{n - 3}} \quad \text{Ec. 3}$$

$$"t" = \frac{Z_0 - Z_1}{S_z \sqrt{\frac{2}{n}}} \quad \text{Ec. 4}$$

Una vez determinado el orden de reacción que más se ajusta a la cinética de degradación, se determina su periodo de validez según el porcentaje de AS libre, cuyo valor puede establecerse con un intervalo de confianza, a un nivel de probabilidad ($p < 0,025$), según la tabla de distribución "t" de Student monolateral (Tico Gran, 1989).

El intervalo de confianza calculando la varianza debida al error experimental (S^2) mediante la siguiente ecuación:

$$S^2 = \frac{\sum y^2 - a \sum y - b \sum xy}{N - 2}$$

Determinando en las ecuaciones de estabilidad las varianzas de los estimadores mínimos cuadráticos a y b:

$$S^2_a = \frac{S^2}{N} - \frac{\sum x^2}{x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}} \quad \text{Ec. 8}$$

$$S^2_b = \frac{S^2}{x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}} \quad \text{Ec. 9}$$

Una vez conocida la varianza de la pendiente (S^2_b) podemos calcular la varianza del valor estimado de validez S^2_t (% AS):

$$S^2_t \text{ (% AS)} = \frac{N^2}{K^4} S^2_b \quad \text{Ec. 10}$$

La desviación standard del período de validez (St % AS) será su raíz cuadrada:

$$St \text{ (% AS)} = \sqrt{S^2_t \text{ (% AS)}} \quad \text{Ec. 11}$$

La construcción del intervalo de confianza del período de validez corresponde a :

$$t \text{ (% AS)} \pm "t" \cdot St \text{ (% AS)} \quad \text{Ec. 12}$$

Siendo:

t (% AS) = período de validez experimental en función del

% AS libre permitido.

"t" = t de Student en monolateral para una probabilidad ($p < 0,025$) y $n-1$ grados de libertad.

St (% AS) = desviación estandard del período de validez.

Captación de humedad.

Se estudia la captación de humedad de muestras de AAS materia prima y de las formulaciones P8 y DS2. Estas muestras se conservan en ambientes a 25°C y una humedad relativa constante que depende de la solución saturada de sal que se utilice. Las humedades relativas utilizadas fueron:

- 50% (solución saturada de Na Br)
- 68% (solución saturada de Na NO₃)
- 95% (solución saturada de K₂ SO₄)

La humedad relativa de las muestras se determina a tiempo cero y cuando se alcanza el valor de equilibrio, en nuestro caso un mes. Como técnica analítica de humedad se utiliza el Karl-Fisher.

5. Gastrototoxicidad.

En este apartado se estudia la acción lesiva sobre la mucosa gástrica del AAS con distinto tamaño de partícula. Así mismo, se estudia la posible actividad protectora del (-)- α -bisabolol, una sustancia que se obtiene por extracción de la manzanilla (*Matricharia chamomilla*).

Método.

Formulaciones:

A - AAS de tamaño comprendido entre 400-500 μm

B - AAS de tamaño comprendido entre 50-200 μm

C - Pelets de AAS (fórmula G1) con un tamaño de partícula 400-500 μm .

D - AAS de tamaño entre 400-500 μm y un 2% de (-)- α -bisabolol.

Solución: CMCNa 1%.

Animales:

El estudio se realiza en 24 ratas Wistar macho, de peso comprendido entre 280-320 g.

Protocolo:

Se aclimatan los animales durante 7 días. Se dejan en ayunas y con agua "ad libitum" durante 12 horas antes y dos horas después de cada administración.

Los animales se dividen en lotes de seis a los que se administran distintas formulaciones, con un equivalente en AAS de 400 mg/Kg peso.

La administración se realiza mediante sonda gástrica, en una solución acuosa de carboximetilcelulosa sódica al 1% en dosis diarias de 0,7 ml/100 g de peso.

La administración se realiza durante tres días consecutivos.

Después de la última dosis se dejan los animales en ayunas durante 24 horas, con agua "ad libitum".

Los animales se sacrifican con éter etílico por inhalación y a continuación se extrae el estómago.

El estómago se lava con solución isotónica del ClNa al 9%, se abren por la curvatura mayor y se evalúa el alcance de sus lesiones empleando una lupa de 10 aumentos, el recuento de las lesiones se realiza mediante la técnica de doble ciego.

Evaluación de las lesiones.

Se estudia el número de lesiones y el tamaño de las mismas. A

continuación se evalúan por dos escalas distintas, según la escala de Morris (1971) y el Índice de Lesiones según Rainsford y col. (1982).

Los resultados obtenidos en cada lote se someten al criterio estadístico de análisis de varianza.

6. Estudio de biodisponibilidad relativa.

Protocolo de ensayo "in vivo".

-Objetivo: Estudio del efecto de la velocidad de cesión en la biodisponibilidad relativa de distintas formulaciones de AAS, mediante datos de excreción urinaria.

-Diseño de ensayo: Se realiza de forma randomizada.

-Selección de voluntarios: 6 jóvenes sanos de edades comprendidas entre 19 y 30 años y $\pm 10\%$ del peso ideal (4 hombres y 2 mujeres), a los que se informó previamente de las características del ensayo, y se obtuvo su consentimiento por escrito para participar en el mismo. Así mismo en cualquier momento podían suspender su participación en el ensayo. La tabla 6 muestra las características físicas de los participantes en los ensayos.

-Formulaciones: Todas las formulaciones se administran por vía oral con 200 ml de agua. La clave de las formulaciones se muestra en la tabla 4.

A - Formulación C2.

B - Formulación C9.

C - Formulación C27.

D - Formulación C15.

E - Formulación C8.

F - Formulación CAP1.

Las formulaciones A, B y C son comprimidos de cesión rápida, mientras que D y E son de cesión más lenta y la formulación F son cápsulas de pelets de cesión entérica.

VOLUNTARIO	SEXO	EDAD (años)	PESO (Kg)	ALTURA (m)
A	V	19	75	1,80
B	V	29	71	1,75
C	V	28	56	1,62
D	V	28	48	1,61
E	H	30	45	1,52
F	H	26	52	1,62

Tabla 6. Características físicas de los voluntarios que participaron en el ensayo de excreción urinaria.

-Administración de las formulaciones: Todas se administran por vía oral con agua (200 ml). La administración se realiza en ayunas. Dos horas después de comenzado el ensayo se permite el desayuno.

-Duración del estudio: 6 días, con un periodo de lavado entre cada administración de al menos dos semanas.

48 horas/ día/ formulación.

-Muestras: Orina. Distinto volumen (hasta vaciamiento total de la vejiga) del que se conservan unos 10 ml después de anotar el volumen total.

-Tiempo de recogida de muestras: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 36 y 48 horas.

-Conservación de muestras: En nevera durante el ensayo y posteriormente se congelan hasta su valoración.

Análisis de salicilatos en orina.

Se utiliza el método colorimétrico de Trinder. Este método que ya ha sido descrito en los métodos analíticos (apartado 2.6.). Mediante este método se pueden valorar los salicilatos libres y totales. En el caso de la excreción renal del AAS se eliminan 5 metabolitos: AS, dos glucurónidos (SPG y SAG), ác. salicílico (SU) y ác. gentísico (AG). De todos estos productos, mediante la técnica de Trinder para salicilatos libres se

determinan AS, AG y parte del salicilúrico (Thiessen, 1982). Por la técnica de salicilatos totales se determinan todos y mediante HPLC se puede determinar el AS (apartado 2.7.).

Proceso de datos y cálculo de biodisponibilidad relativa.

Una vez conocida la concentración de salicilatos totales se multiplica por el volumen de orina y se calcula la cantidad excretada. Posteriormente se representa la velocidad de excreción a distintos tiempos y la cantidad excretada en forma acumulada.

La cantidad total excretada en orina al cabo de 48 horas dan una idea de la biodisponibilidad de la formulación.

Otros parámetros importantes que se han estudiado son el valor máximo de velocidad de excreción y el tiempo a que aparece ese máximo (Peraire, 1991). Estos valores dan una idea de la rapidez con que se absorbe el AAS y las cantidades absorbidas.

Los valores de biodisponibilidad relativa según datos de cantidad total excretada se calculan tomando como referencia la formulación A.

$$\text{B.R.} = \frac{\text{muestra}}{\text{referencia}} \times 100$$

Estudio estadístico.

En las figuras y tablas se representan los valores medios (\bar{x}). La desviación estándar (σ_{n-1}) se suele poner entre paréntesis al lado de la media.

Los valores y diferencias entre las distintas formulaciones se estudian mediante un análisis de varianza (ANOVA), según el programa estadístico SIGMA. El valor significativo o no de los resultados se acompaña con la posibilidad de error debida al azar que existe en esta afirmación.

RESULTADOS Y DISCUSION PARCIAL

1. Características y validación de los métodos de análisis utilizados.

Como ya se ha descrito en la parte de métodos, todas las técnicas analíticas utilizadas son eficaces para el análisis requerido en cada caso.

Las características de las técnicas analíticas se describen en la tabla 7.

Método Analítico	Margen de Concentrac. ($\mu\text{g/ml}$)	Sensibilidad ($\mu\text{g/ml}$)	Tiempo de duración análisis (min)	Coeficiente de variación	Principio Activo
Espectrofotometría	25,5-300	25,5	5	0,9998	AAS
Colorimetría	10-250	10,5	5	0,9994	Sl
Espectrofotometría de segunda derivada	5-100	5,0	6	0,9972 0,9984	St AS
Fluorimetría	0,5-10	0,5	5	0,9696	AS
HPLC	5-75	5,0	40	0,9928 0,9956	AS AAS
Cromatografía en capa fina	2-250	2,0	60		AS AAS

Tabla 7. Características analíticas de los distintos métodos usados para la determinación de AAS y AS, salicilatos libres (Sl) y salicilatos totales (St).

La espectrofotometría UV (en el punto isosbético) presenta un margen de concentración amplio (25,5-300 $\mu\text{g/ml}$), aunque tiene una sensibilidad baja 25,5 $\mu\text{g/ml}$. Su rapidez y sencillez le hace apto para los estudios de disolución del AAS.

La colorimetría determina los salicilatos libres y totales en orina. Presenta buena sensibilidad, 10 $\mu\text{g/ml}$, y un amplio margen de concentración, 10-250 $\mu\text{g/ml}$, lo que unido a su rapidez le hace que sea, pese a su antigüedad (Trinder, 1954), una técnica de elección junto al HPLC.

La fluorimetría tiene su principal ventaja en su gran sensibilidad (0,5 $\mu\text{g/ml}$). Su estrecho margen de concentración 0,5-10 $\mu\text{g/ml}$ y su bajo coeficiente de variación (0,9696) hacen que su utilidad en nuestro caso, se reduzca a algunos estudios comparativos de estabilidad.

La espectrofotometría por segunda derivada tiene su principal ventaja en ser una técnica rápida, en la que los espectros de AAS y AS no se interfieren, lo que unido a una buena sensibilidad 5 $\mu\text{g/ml}$, es por lo que la hemos considerado como técnica analítica de elección para estudios de estabilidad. En estos estudios se acompaña de análisis por cromatografía en capa fina.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), tiene su característica más importante en ser una buena técnica separativa, con buena sensibilidad, 5 $\mu\text{g/ml}$ y con un error analítico bajo, 0,50%. Su

principal inconveniente es el no poder considerarla como una técnica rápida si la comparamos con las otras técnicas, y el tiempo de análisis por muestra es de 9,01 minutos para salicilatos en orina y de 9,29 y 14,19 minutos para el AS y el AAS respectivamente, en estudios de estabilidad. Se emplea como técnica de análisis alternativa y de validación en estudios de estabilidad y biodisponibilidad relativa.

La cromatografía de capa fina, cuenta entre sus principales ventajas el que se trata de una técnica separativa así como su gran sensibilidad, detectando hasta 2 μg tanto de AAS como de AS. Sus inconvenientes son el ser una técnica, en nuestro caso, cualitativa, no cuantitativa y el de presentar un elevado tiempo de análisis por muestra.

Validación del método analítico de segunda derivada

Los estudios de linealidad, exactitud y precisión se hacen por HPLC, mientras que especificidad es por HPLC y cromatografía en capa fina.

Antes de utilizar el método de segunda derivada en los estudios de estabilidad del AAS, lo comparamos y validamos frente a un método separativo como es el de cromatografía. Los resultados de análisis de AS se recogen en la tabla 8 y figura 8.

Concentración teórica AS ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración encontrada AS ($\mu\text{g/ml}$)	
	Método de referencia (HPLC)	Método a evaluar (2 ^a Derivada)
10,0	10,39 \pm 0,21	10,08 \pm 0,23
15,0	15,09 \pm 0,37	15,01 \pm 0,42
20,0	19,47 \pm 0,56	19,83 \pm 0,61
25,0	25,33 \pm 0,68	24,93 \pm 0,79
30,0	30,59 \pm 0,85	30,03 \pm 0,98
35,0	35,07 \pm 0,99	35,13 \pm 1,11

Tabla 8. Resultados de la validación del método analítico de espectrofotometría de segunda derivada frente a un método de referencia.

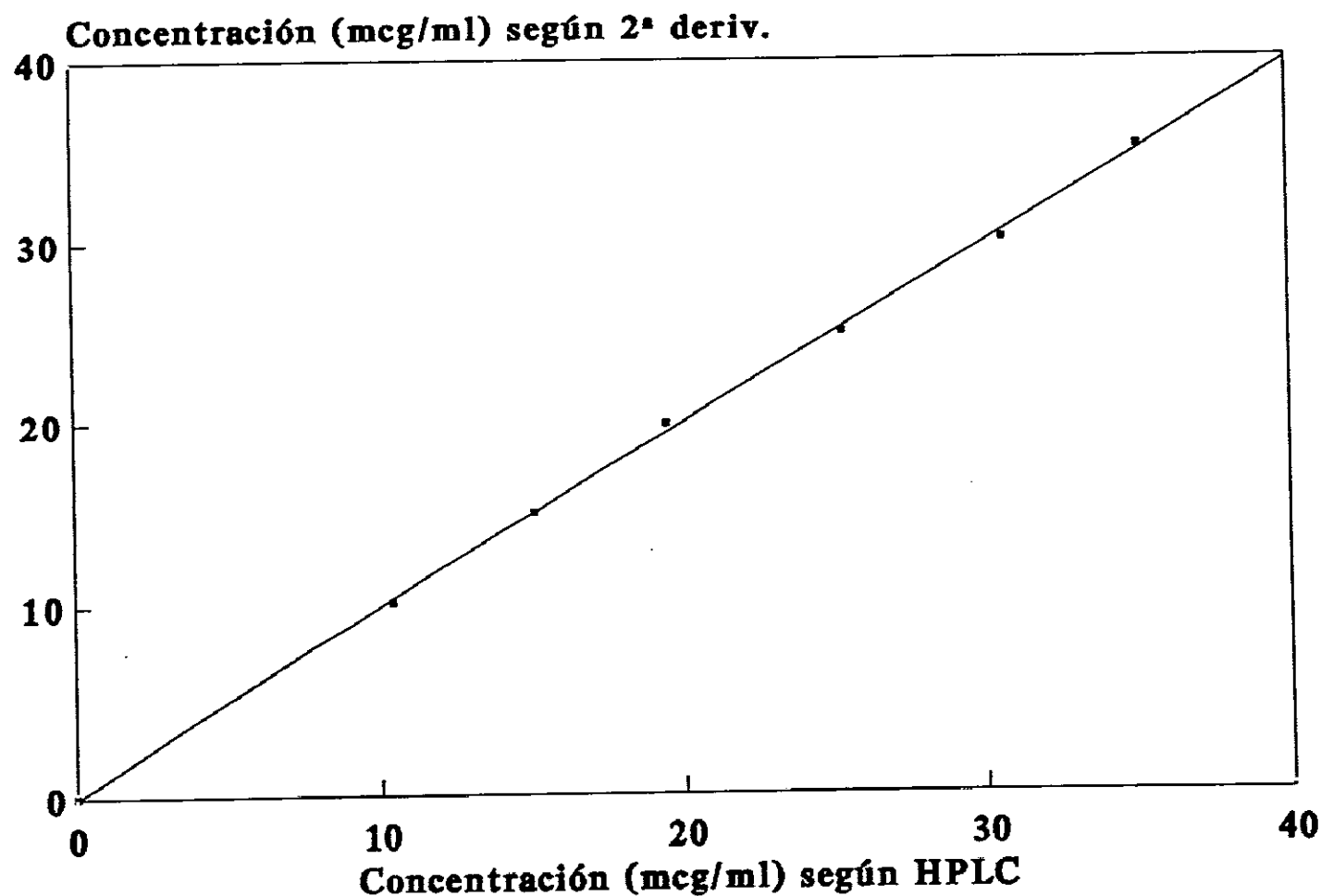


Figura 8. Representación gráfica de la relación lineal existente entre los resultados obtenidos de analizar una misma muestra mediante HPLC y espectrofotometría de segunda derivada.

Linealidad.

El análisis de regresión se efectúa mediante los datos de la tabla 8 y se muestra en la figura 8.

- Cálculos.

$$S_y^2 = 0,14022$$

$$S_b^2 = 3,172 \cdot 10^{-4}$$

$$S_b = 0,017810$$

$$S_{b_{rel}} = 1,787$$

Al presentar una desviación estándar relativa ($S_{b_{rel}} < 2\%$) cumple el test de linealidad.

- Límites de confianza de la pendiente ($p < 0,05$)

$$b \pm t'' S_b$$

$$0,9966 \pm 0,0494$$

Este valor incluye el uno, por lo que el límite de confianza de la pendiente es válido con una probabilidad ($p < 0,05$).

Proporcionalidad.

$$S_a^2 = 0,18619$$

$$S_a = 0,4315$$

Límite de confianza:

$$a \pm "t" S_a$$

$$-0,0779 \pm 1,1978$$

No presenta sesgo al no pasar la recta por el origen de coordenadas.

Exactitud.

Repetimos el análisis, 6 veces, de una muestra de 20 µg/ml por ambos métodos

Test F de Snedecor

$$n_{HPLC} = 6 \times S_{HPLC} = 19,47 \quad S_{HPLC} = 0,5621 \quad S_{HPLC}^2 = 0,3159$$

$$n_{2 \text{ deriv}} = 6 \times S_{2 \text{ deriv}} = 19,83 \quad S_{2 \text{ deriv}} = 0,6123 \quad S_{2 \text{ deriv}}^2 = 0,3749$$

$$F_{exp} = 0,8423$$

$$F_{tablas} (GL_{HPLC} = 5; GL_{2 \text{ deriv}} = 5; p < 0,10) = 5,05$$

$F_{exp} < F_{tablas}$. Por lo tanto ambos métodos tienen una exactitud semejante.

Test "t" de Student

$$s^2 = 0,09325$$

$$t_{exp} = 1,8640$$

$$t_{tablas} (GL_{HPLC} = 5; GL_{2 \text{ deriv}} = 5; p < 0,05) = 2,23$$

$t_{exp} < t_{tablas}$. Estos métodos no difieren con una probabilidad del 95%.

Especificidad.

Se comprueba mediante análisis periódicos por cromatografía en capa fina (TLC) y HPLC que no existen otras sustancias que pueden interferir en el análisis de las muestras de los ensayos de estabilidad mediante el método de segunda derivada.

2. Características farmacotécnicas.

En la tabla 9 se describen las características de las formulaciones de pelets, granulados y dispersiones sólidas estudiadas.

Las características de velocidad de disolución en forma acumulada se representan en las siguientes figuras 9-19.

En la figura 9 se representa la velocidad de disolución de la formulación de cesión convencional, es decir de velocidad de disolución rápida (formulaciones P2, P3, G1, DS1 y DS2) y se comparan con cristales de AAS.

Los valores de TD50, TD80 y %D30 de las formulaciones de cesión convencional se muestran en la tabla 10.

De los resultados de velocidad de disolución de estas formulaciones de cesión rápida (fig. 9 y tabla 10) se puede observar como existe una diferencia significativa ($P < 0,01$) entre la velocidad de cesión de la formulación de cristales de AAS de referencia y la formulación G1, este hecho se debe probablemente al pequeño tamaño de partícula de los cristales que constituyen el gránulo de la formulación G1. Cuando se utiliza Eudragit E como agente aglutinante la velocidad de cesión y disolución con respecto a la formulación G1 disminuye y se parece más a la del AAS de referencia. La existencia de un 10% de almidón en la formulación P2 da lugar a una ve-

locidad de cesión más rápida, por el efecto disgregante de este excipiente. La dispersión sólida de manitol (DS1) tiene una velocidad de cesión más rápida que la de FVP (DS2), que a su vez es bastante parecida a la del AAS que tomamos como patrón. El orden de velocidad de cesión y disolución sería:

G1 > DS1 > P2 > P1 > AAS patrón > DS2

Formulación Clave	Tamaño (μm)	Contenido (% p/p)	
		AAS	AS
P1	400-500	89,96	0,18
P2	400-500	86,21	0,20
P3	400-500	81,14	0,17
P4	400-700	77,06	0,78
P5	400-700	76,89	0,50
P6	400-700	84,89	0,47
P7	400-700	81,02	0,49
P8	400-700	79,06	0,51
P9	400-700	74,68	0,54
P10	400-700	70,27	0,70
G1	400-500	99,86	0,06
DS1	400-500	76,42	0,08
DS2	400-500	74,84	1,11

Tabla 9. Características de las formulaciones de pelets, granulados y dispersiones sólidas.

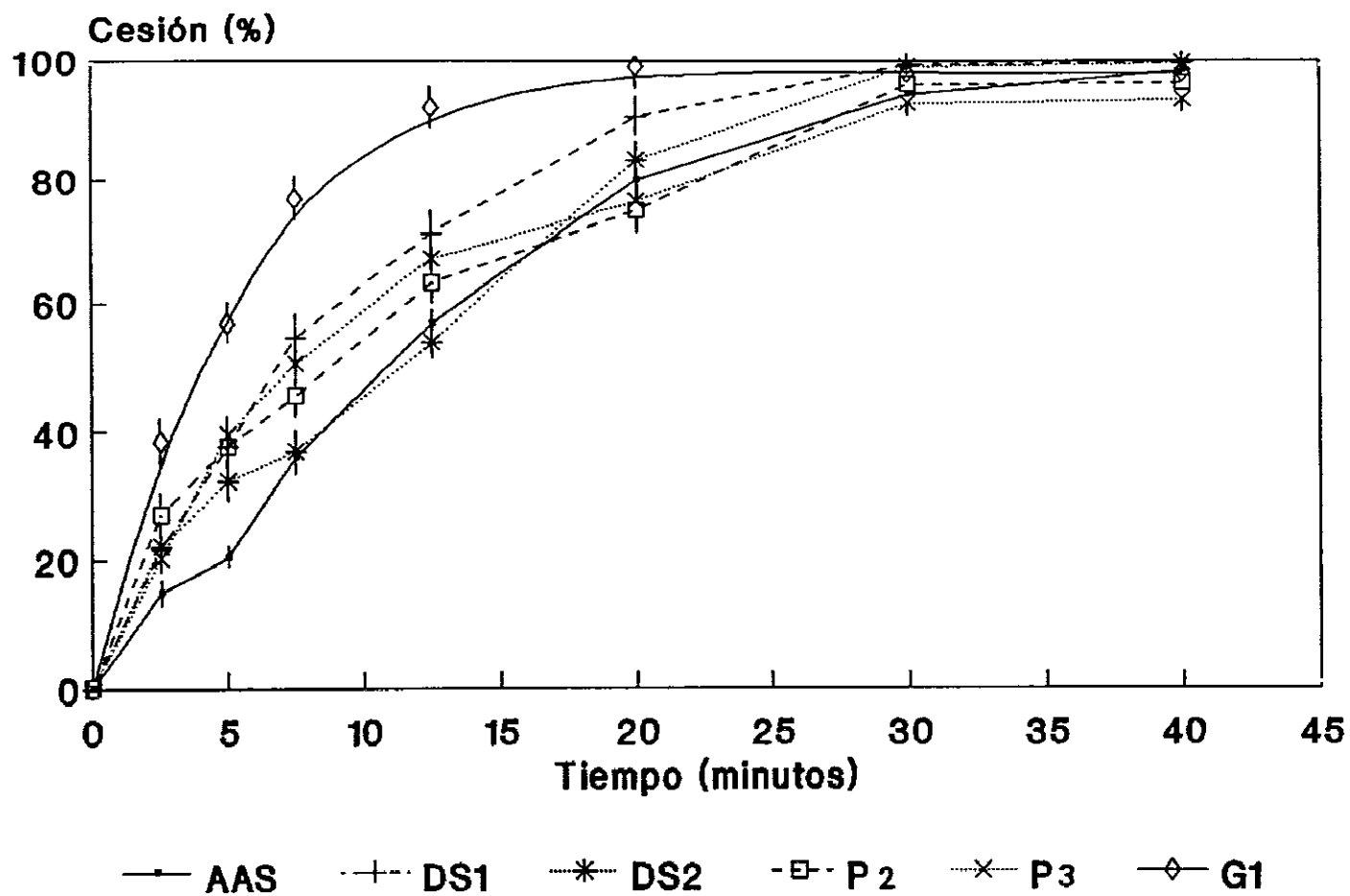


Figura 9. Ensayo de velocidad de disolución a pH 4,5 de las formulaciones DS1, DS2, P2, P3 y G1 frente a un AAS patrón.

	TD-50% (min)	TD-80% (min)	% D30 (min)	Significativo TD50 p<0,01
<u>Materias primas</u>				
AAS Merck 400-500 μ	10,72	20,00	94,38 \pm 3,73	
<u>Pelets</u>				
P2	8,84	26,5	95,90 \pm 0,83	NS
P3	7,33	23,5	90,40 \pm 2,07	NS
G1	3,67	8,0	97,94 \pm 2,13	S
<u>Dispersiones sólidas</u>				
DS1 (M)	6,69	16,68	99,25 \pm 0,21	S
DS2 (PVP)	11,41	18,50	99,05 \pm 0,16	NS

Tabla 10. Estudio de los parámetros experimentales de disolución en partículas de cesión rápida.

La figura 10 muestra los resultados de los ensayos de velocidad de cesión y disolución de las formulaciones de cesión sostenida de pelets: P4, P5, P6, P7, P8 y P10 a pH 6,8.

En la figura 11 se representan los resultados de la velocidad de cesión de la formulación P4 en medio ácido (pH 1,4). En todos los casos se compara con cristales de AAS.

A pH neutro (6,8) las formulaciones de Eudragit L (formulación P4) y RL (formulación P5) al 13% p/p no muestran diferencias significativas en cuanto a velocidad de cesión en comparación con cristales de AAS. Cuando se estudia la cesión de la formulación P4 en medio ácido (pH 1,4) se comprobó que aquí sí se retrasa de manera significativa la velocidad de cesión y disolución del AAS recubierto, lo cual concuerda con las características y especificaciones del Eudragit L, ya que se utiliza en la formación de membranas y cubiertas entéricas. Los Eudragit RL y RS tienen una cesión independiente del pH (Röhm Pharma) por lo que no se estudió la velocidad de cesión a distintos pH. El Eudragit RL es más permeable que el RS y por esta razón la velocidad de cesión de la formulación P5 es más rápida que las de RS.

En las formulaciones P6, P7, P8 y P10, se estudia el efecto del porcentaje de Eudragit utilizado y la velocidad de cesión: Como es lógico a mayor porcentaje de Eudragit más lenta es la difusión del AAS y se retrasa la cesión y disolución. Este efecto se puede ver en la tabla 11 en la que se muestran los retrasos con velocidad de disolución de formulaciones con

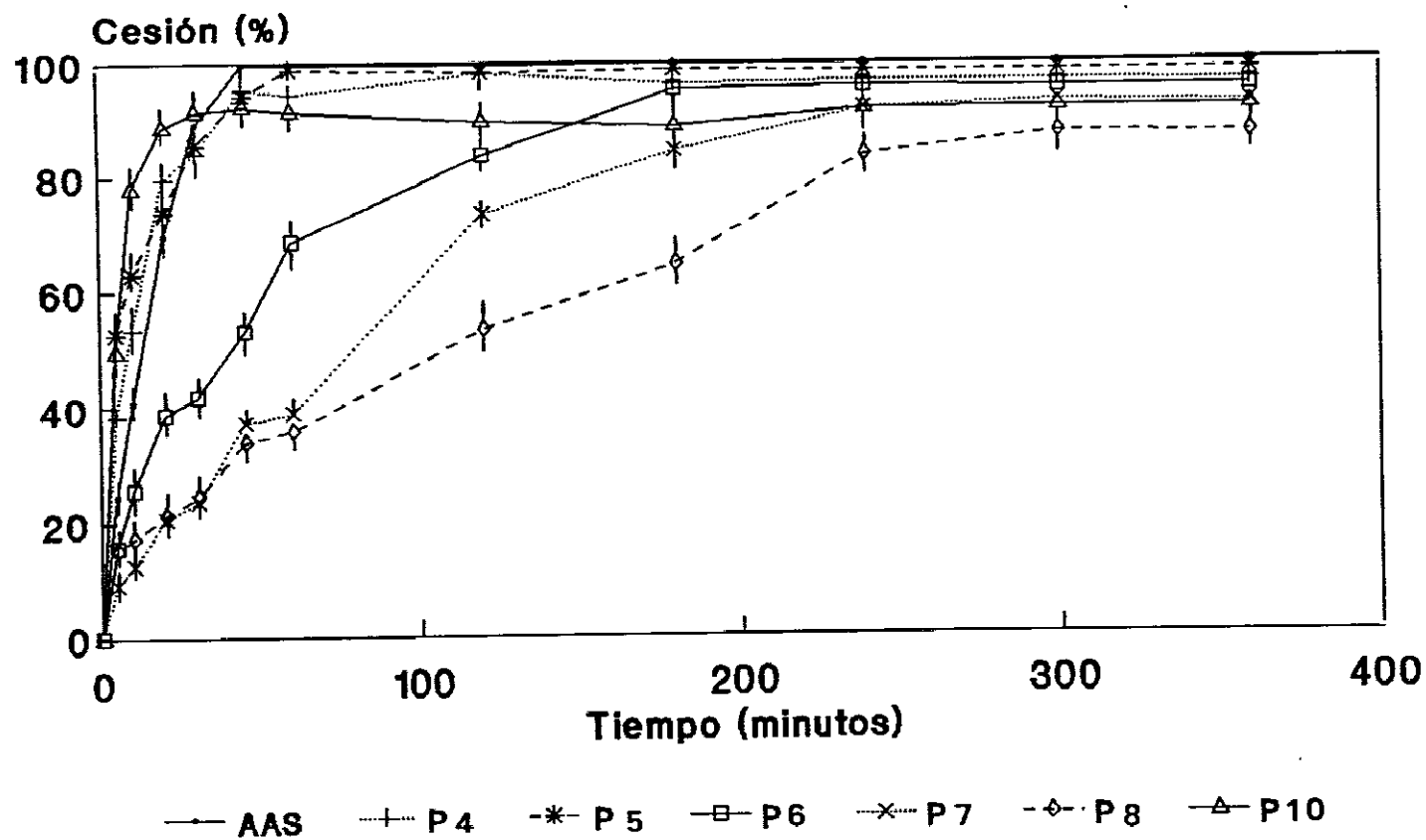


Figura 10. Ensayo de velocidad de disolución a pH 6,8 de las formulaciones de peltes

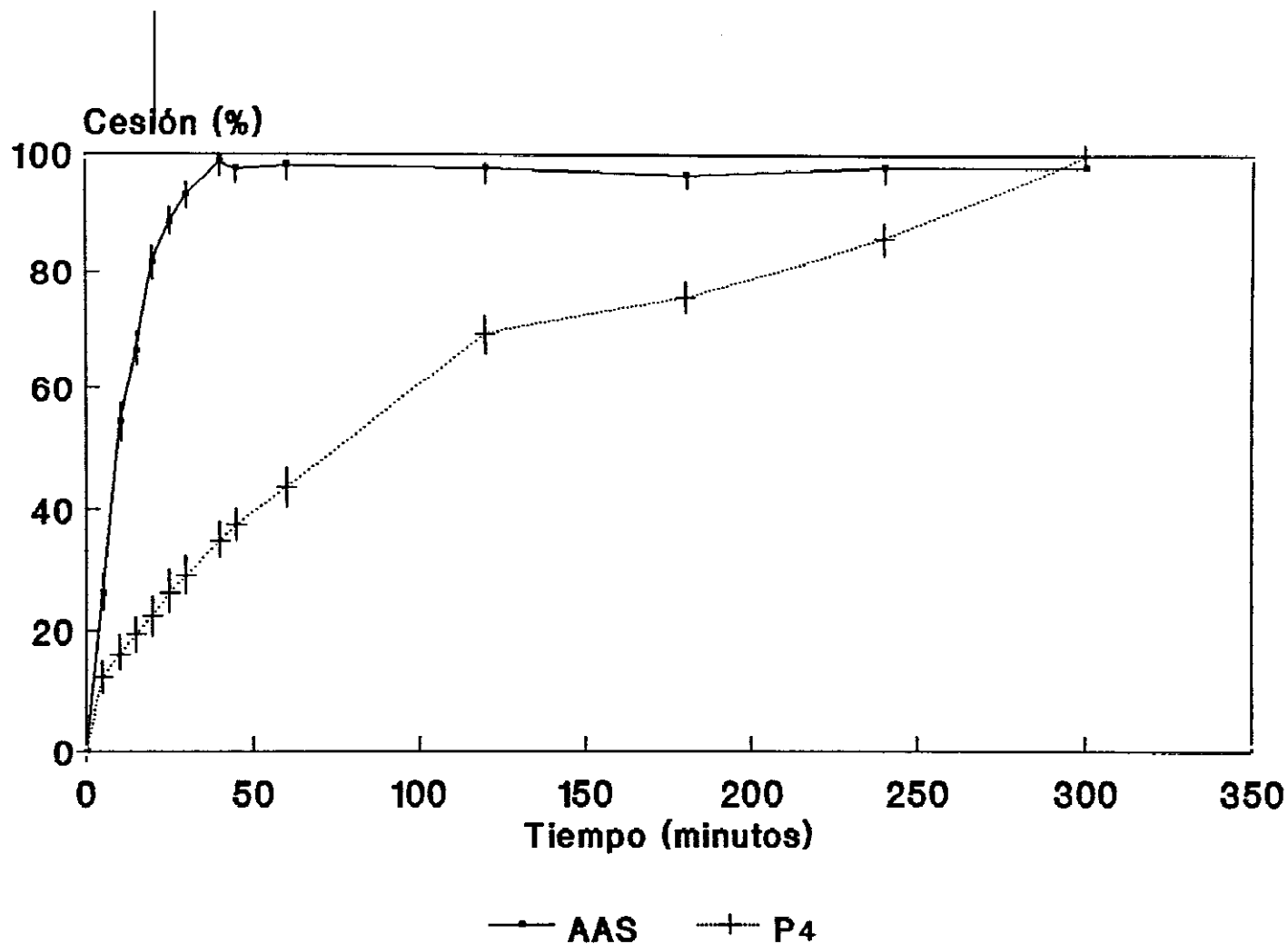


Figura 11. Ensayo de velocidad de disolución a pH 1,4 de la formulación de pelets P4 frente a AAS patrón.

distintos porcentajes de recubrimiento en comparación con los cristales de AAS de referencia.

Recubrimiento	Formulación	Retraso en los tiempos de disolución con referencia a AAS, materia prima.	
(%)		(50%)	(80%)

0	AAS Materia prima	1	1
5	P6	0,61	0,82
10	P7	2,42	3,14
13	P8	6,03	7,50
20	P10	10,07	26,86

Tabla 11. Retraso con referencia al AAS materia prima de los TD 50% y TD 80% en función del porcentaje recubierto con Eudragit RS.

Con recubrimientos del 5% no se logra obtener retrasos en los TD 50% y TD 80%.

Con recubrimientos superiores al 20% (25% p/p) aparecen problemas durante el proceso tecnológico de elaboración y se obtiene un recubrimiento no homogéneo y con un rendimiento bajo. Los pelets recubiertos al 20% fueron seleccionados para posteriores estudios de estabilidad y ensayos de biodisponibilidad en humanos.

La tabla 12 muestra las características de peso, riqueza y resistencia a la fractura de las formulaciones de comprimidos estudiadas.

Formulación	Variación de peso (mg) (RSD)	Contenido (AAS)	Resistencia a la fractura (U.E.)
C1	626,4 (2,15)	98,17 ± 2,17	6,8 ± 0,35
C2	658,2 (2,08)	97,17 ± 1,97	6,8 ± 0,41
C3	616,5 (1,47)	98,26 ± 1,87	4,8 ± 0,42
C4	504,8 (1,13)	102,81 ± 1,27	7,4 ± 0,39
C5	593,8 (1,57)	98,14 ± 1,72	10,8 ± 0,40
C6	517,6 (1,27)	96,27 ± 2,36	6,5 ± 0,38
C7	533,4 (2,22)	97,62 ± 2,42	6,6 ± 0,61
C8	550,3 (2,62)	98,54 ± 1,82	6,4 ± 0,42
C9	494,4 (2,97)	99,72 ± 2,41	13,9 ± 1,30
C10	603,5 (2,32)	97,82 ± 1,86	6,5 ± 0,71
C11	737,7 (2,06)	98,41 ± 2,06	6,8 ± 0,39
C12	670,1 (1,87)	98,47 ± 2,14	7,0 ± 0,49
C13	705,0 (1,72)	96,87 ± 3,14	6,8 ± 0,39
C14	493,4 (2,04)	98,14 ± 2,16	15
C15	805,6 (2,80)	97,27 ± 1,82	6,8 ± 0,48
C16	619,0 (1,42)	96,94 ± 2,06	7,1 ± 0,61
C17	665,9 (2,62)	99,12 ± 1,63	7,1 ± 0,72
C18	705,8 (2,09)	96,92 ± 2,06	7,0 ± 0,68
C19	801,2 (1,67)	98,81 ± 1,47	7,3 ± 0,71
C20	631,1 (1,43)	97,06 ± 1,62	7,5 ± 0,54
C21	667,3 (2,47)	98,02 ± 2,06	7,4 ± 0,81
C22	704,2 (3,07)	99,14 ± 1,72	7,3 ± 0,43
C23	803,4 (2,33)	98,62 ± 2,17	7,4 ± 0,37
C24	570,1 (2,22)	98,14 ± 2,60	6,5 ± 0,61
C25	758,7 (1,97)	97,72 ± 1,86	6,9 ± 0,34
C26	593,6 (1,21)	98,27 ± 1,09	3,3 ± 0,46
C27	601,0 (2,13)	98,12 ± 2,06	6,5 ± 0,55
CAP1	429,3 (1,89)	99,60 ± 3,12	

Tabla 12. Características de los distintos comprimidos evaluados.

Todas las formulaciones de comprimidos están dentro de los límites del ensayo de variación de peso.

La figura 12 muestra los resultados de velocidad de disolución de los comprimidos convencionales en comparación con cristales patrón de AAS.

Los valores de TD 50, TD 80 y D 30 de las formulaciones de comprimidos de cesión convencional se muestran en la tabla 13.

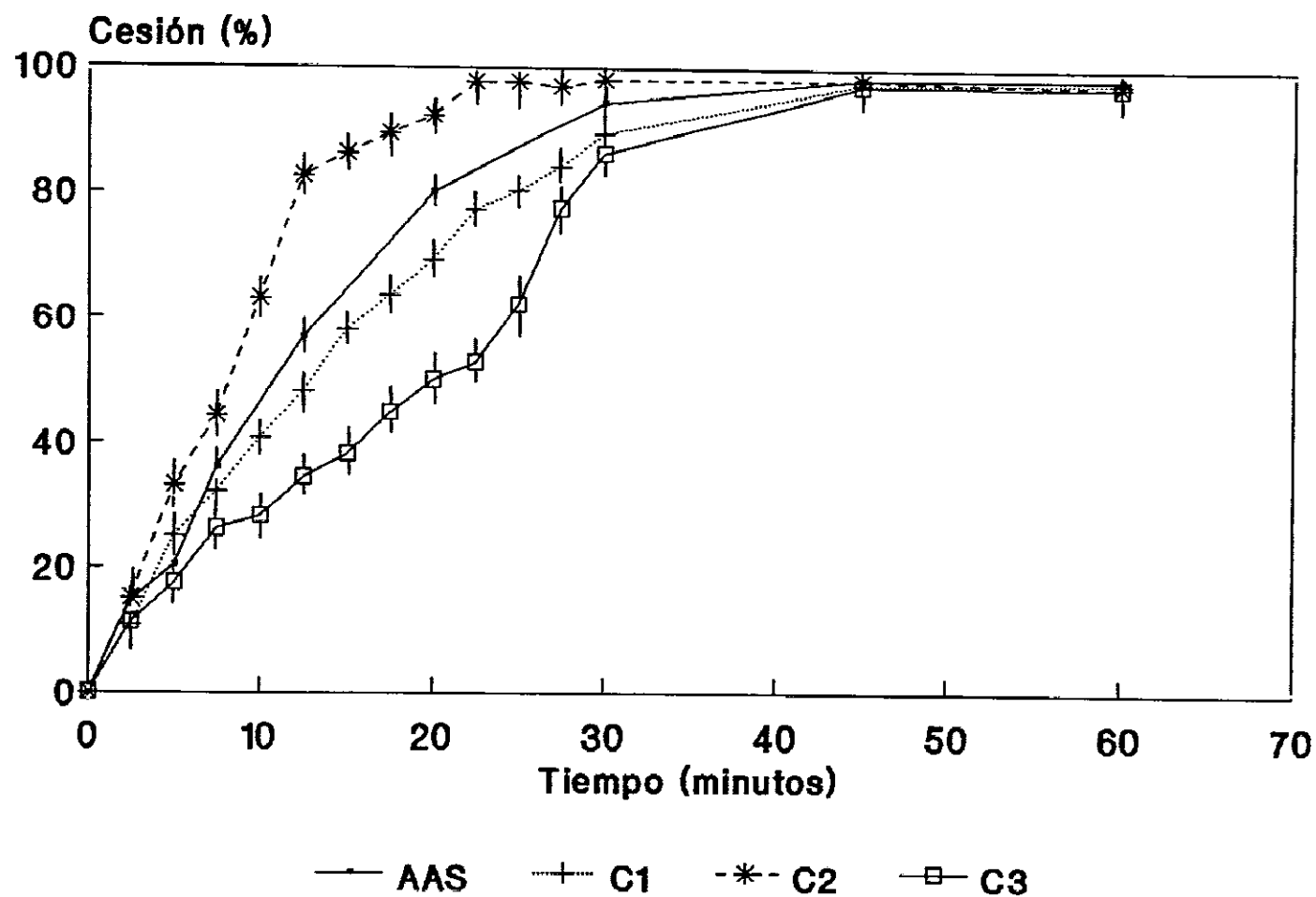


Figura 12. Ensayo de velocidad de disolución a pH 4,5 de las formulaciones C1, C2 y C3 frente a AAS patrón.

Formulación Comprimidos Convencionales	TD 50% (min)	TD 80% (min)
AAS cristal	10,7	20
C1	13	25
C2	8	12
C3	20	28

Tabla 13. Valores experimentales en las distintas formulaciones de comprimidos convencionales para los tiempos de disolución 50% y 80%.

Las formulaciones C1 y C2 tienen una velocidad de cesión y disolución más rápida que la formulación C3 y son bastante parecidos a los cristales de AAS de referencia. Todas las formulaciones cumplen con el requerimiento de velocidad de disolución de la USP XXII (1990). El orden de velocidad de disolución para las distintas formulaciones sería:

$$C2 > AAS > C1 > C3$$

En cuanto a los comprimidos de cesión sostenida se han estudiado distintas formulaciones con varios excipientes.

En la figura 13 se muestra la velocidad de cesión y disolución de 5

formulaciones constituidas por mezclas en distintas proporciones de AAS y pelets de AAS (formulación P10) y se comparan con AAS sin comprimir.

Las características TD 50 y TD 80 de las formulaciones C4, C6, C7, C8 y C10, se muestran en la tabla 14.

Como se puede apreciar en la tabla 14, conforme se aumenta la proporción de pelets en la formulación se retrasa la velocidad de cesión y disolución. A continuación se estudió el efecto de distintos excipientes en distintas proporciones en la velocidad de cesión de los comprimidos obtenidos. Los excipientes utilizados fueron: Avicel PH 102, almidón de trigo y Celutab.

Las figuras 14, 15 y 16 muestran los resultados de los comprimidos obtenidos utilizando respectivamente, Avicel PH 102, almidón de trigo y Celutab en distintas proporciones y se comparan con AAS sin microencapsular.

Los valores de TD50 y TD80 de las formulaciones de comprimidos de pelets con distintos excipientes en distintas proporciones se pueden ver en la tabla 15.

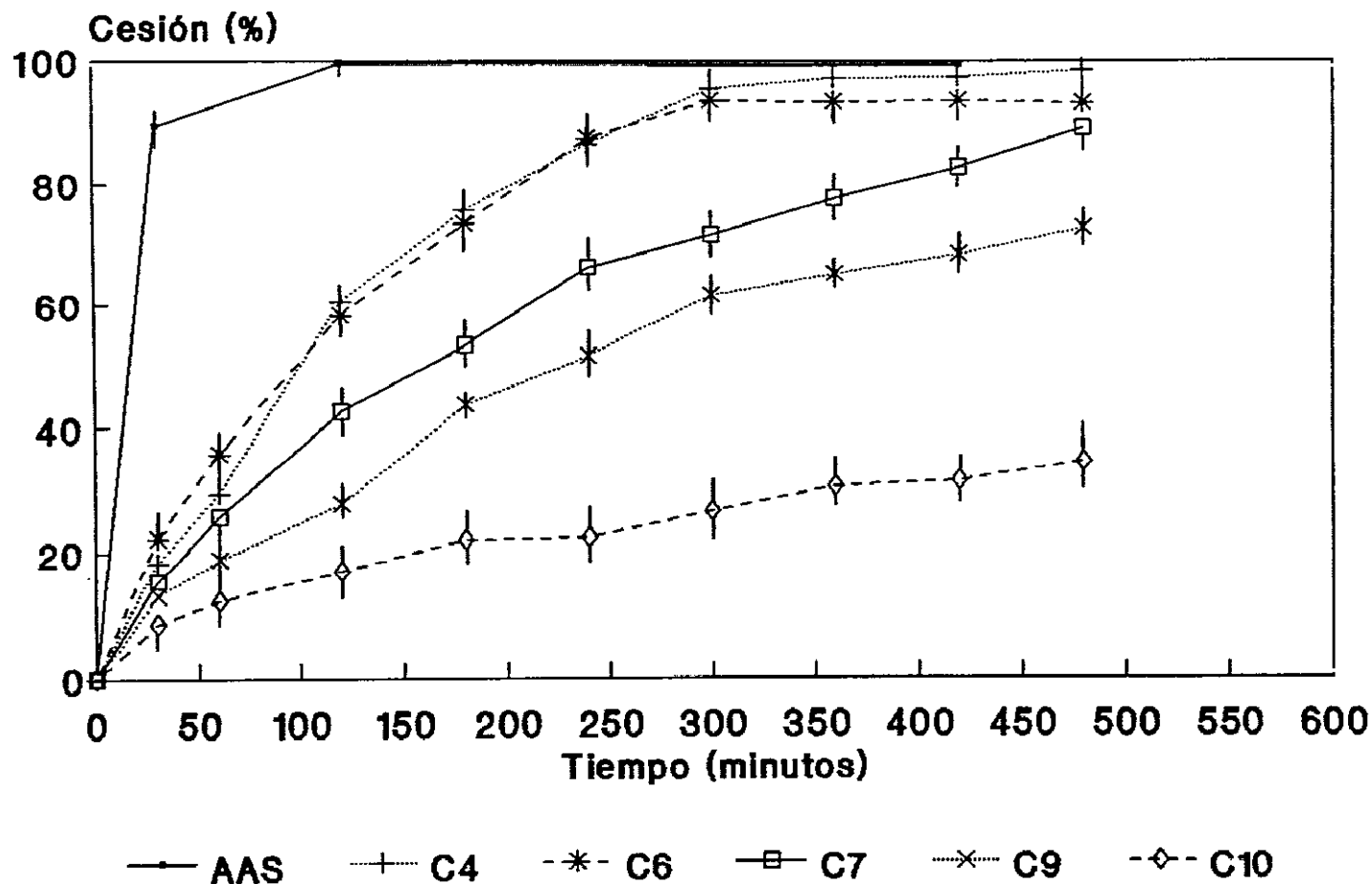


Figura 13. Ensayo de velocidad de disolución a pH 6,8 de formulaciones constituidas por mezclas en distintas proporciones de AAS y pellets recubiertos de AAS. Formulaciones C4, C6, C7, C9, C10 frente a AAS patrón.

FORMULACION	TD50%	TD80%
AAS	13 min	25 min
C4	1 h 40 min	3 h 20 min
C6	1 h 40 min	3 h 40 min
C7	2 h 40 min	6 h 40 min
C8	3 h 40 min	—
C10	—	—

Tabla 14. Valores experimentales de los tiempos de disolución 50% y 80% para distintos comprimidos en comparación con AAS patrón.

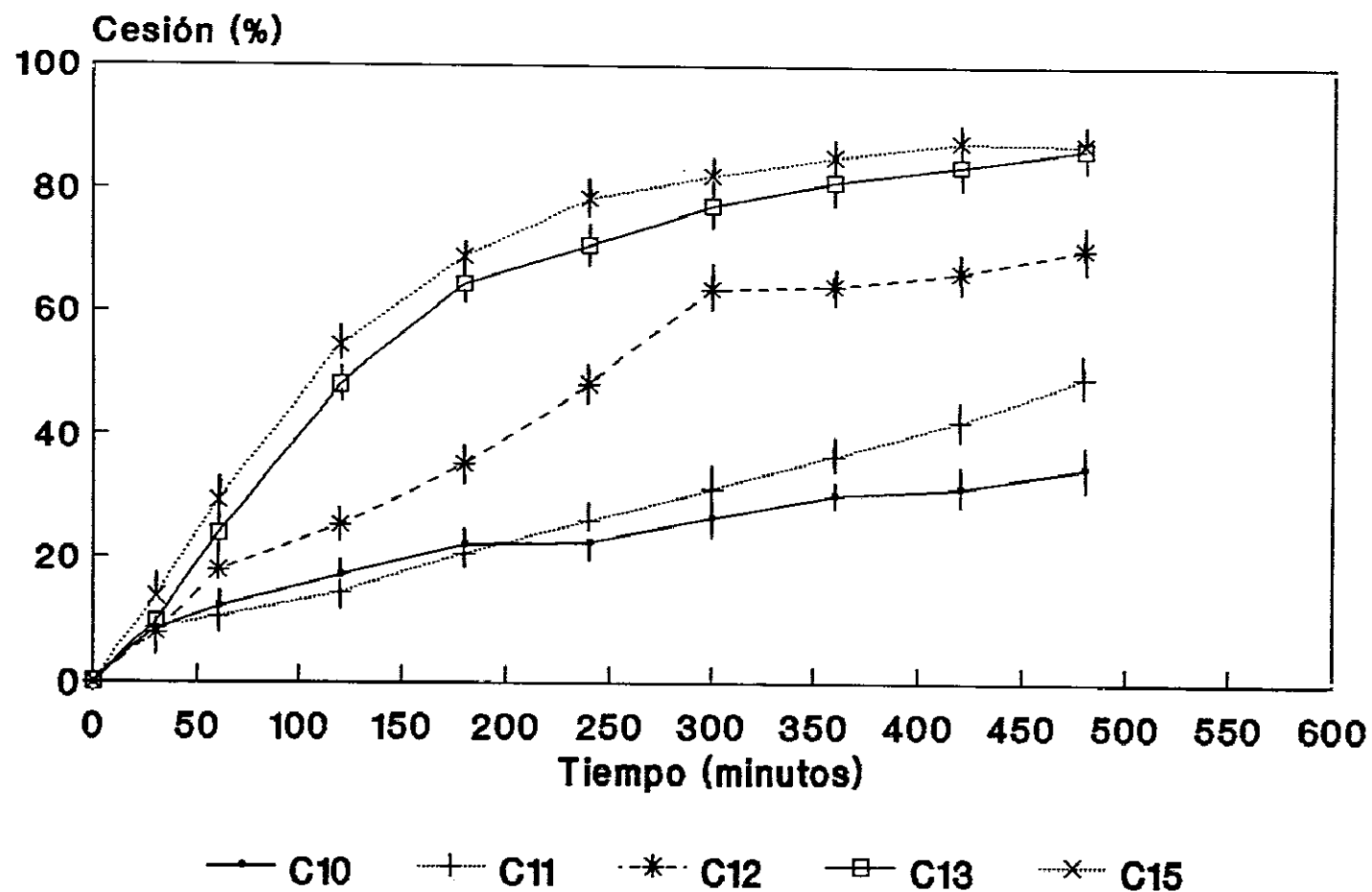


Figura 14. Ensayo de velocidad de disolución a pH 6,8 de formulaciones con distinto porcentaje de Avicel PH 102. Formulaciones C10, C11, C12, C13 y C15.

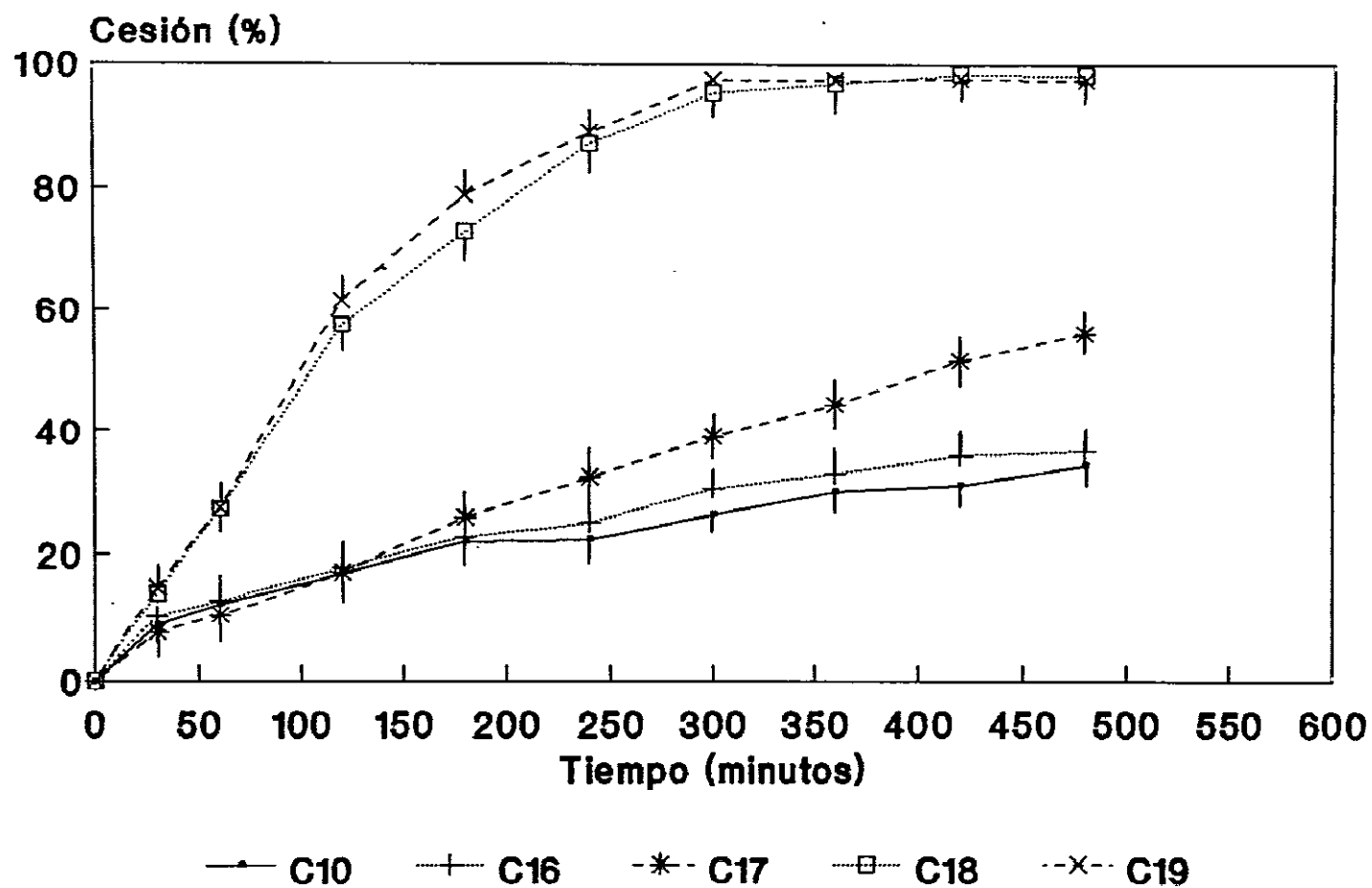


Figura 15. Ensayo de velocidad de disolución a pH 6,8 de formulaciones con distinto porcentaje de almidón de trigo. Formulaciones C10, C16, C17, C18 y C19.

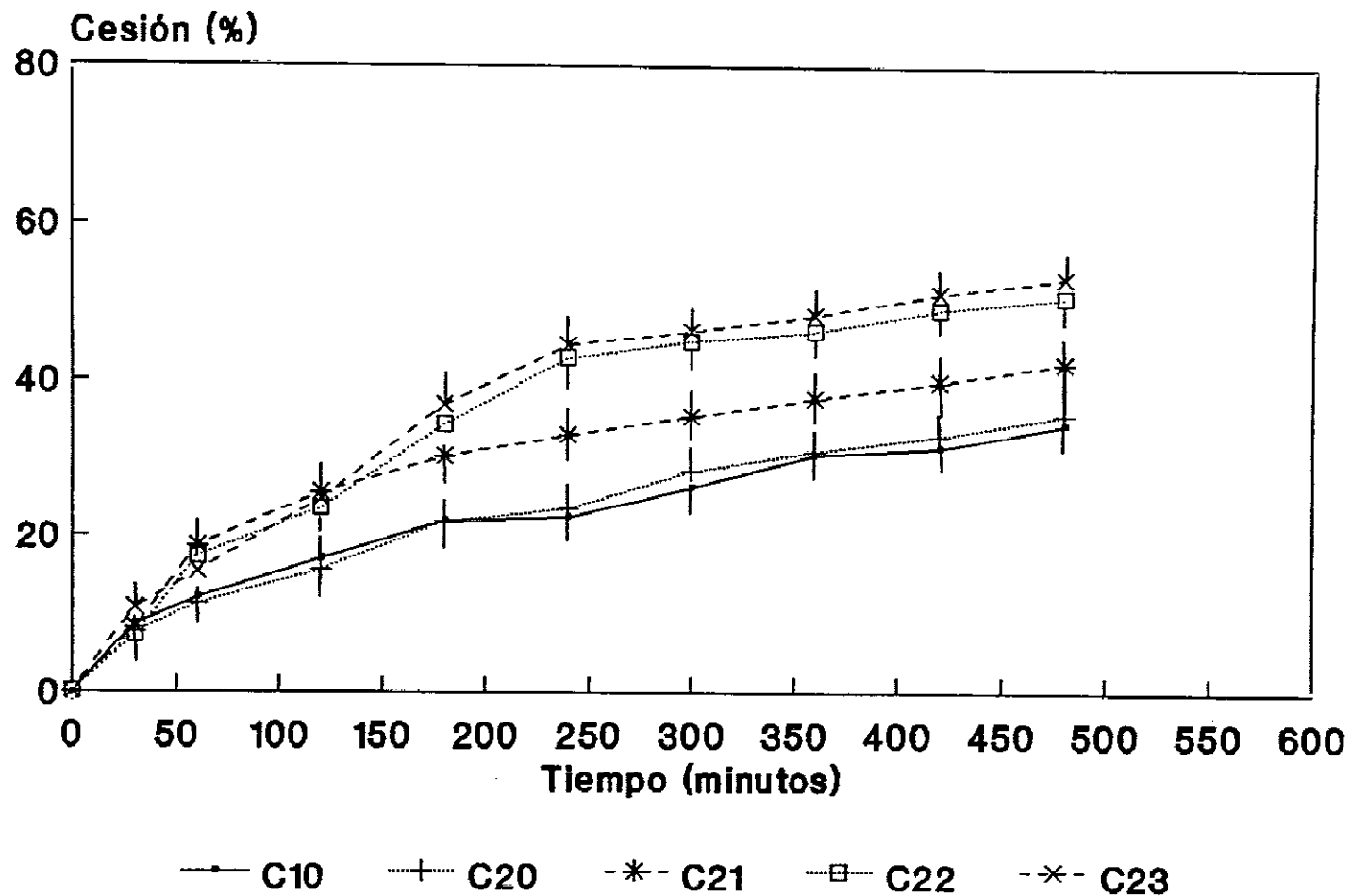


Figura 16. Ensayo de velocidad de disolución a pH 6,8 de formulaciones con distinto porcentaje de Celutab. Formulaciones C10, C20, C21, C22 y C23.

FORMULACION	TD50%	TD80%
C10	—	—
C11	—	—
C12	4 h 10 min	—
C13	2 h 5 min	5 h 40 min
C15	1 h 50 min	4 h 25 min
C16	—	—
C17	6 h 50 min	—
C18	1 h 40 min	—
C19	1 h 35 min	3 h
C20	—	—
C21	—	—
C22	7 h 40 min	—
C23	6 h 40 min	—

Tabla 15. Valores experimentales de los tiempos de disolución 50 y 80% en las formulaciones de comprimidos de pelets (P10) con distintos excipientes y en proporciones crecientes.

Con todos los excipientes utilizados, al aumentar la proporción de los mismos se aumenta la velocidad de cesión y disolución, este hecho es más acusado en el caso del Avicel PH 102 y el almidón de trigo que en el de Celutab. Resultados similares han sido descritos por Alys y Vdeala (1987). En el caso del Avicel y el almidón de trigo este hecho se debe a la capacidad disgregante de estos excipientes, mientras que en el caso del Celutab se debe a su carácter hidrosoluble. Al disolverse el excipiente crea unos canalículos por donde se puede ceder y disolver el AAS.

La figura 16 muestra los resultados de velocidad de cesión y disolución a pH 6,8 de cuatro formulaciones de comprimidos (C24, C25, C26 y C27) y una formulación de cápsulas (CAP1) y se comparan con AAS sin comprimir. La velocidad de cesión y disolución de estas mismas formulaciones se estudia también a pH ácido (1,4) y en un medio en el que se produce cambio de pH (método de cesión prolongada USP XXII, 1990). Los resultados se muestran en las figuras 17, 18 y 19. Los parámetros de TD50 y TD80 se pueden observar en la tabla 16. Como se puede apreciar, la formulación C26 (Rhonal) tiene una velocidad de cesión y disolución más independiente del pH, mientras que las formulaciones C24, C25 y CAP1 son dependientes del pH. La formulación C27 (Adiro), por presentar unos TD50 y TD80 inferiores a los 30 minutos, no podemos evaluar su dependencia respecto al pH.

En el caso de las formulaciones C24 y C25 se vuelve a comprobar cómo

la adición de Avicel PH 102 puede aumentar la velocidad de cesión y disolución del AAS.

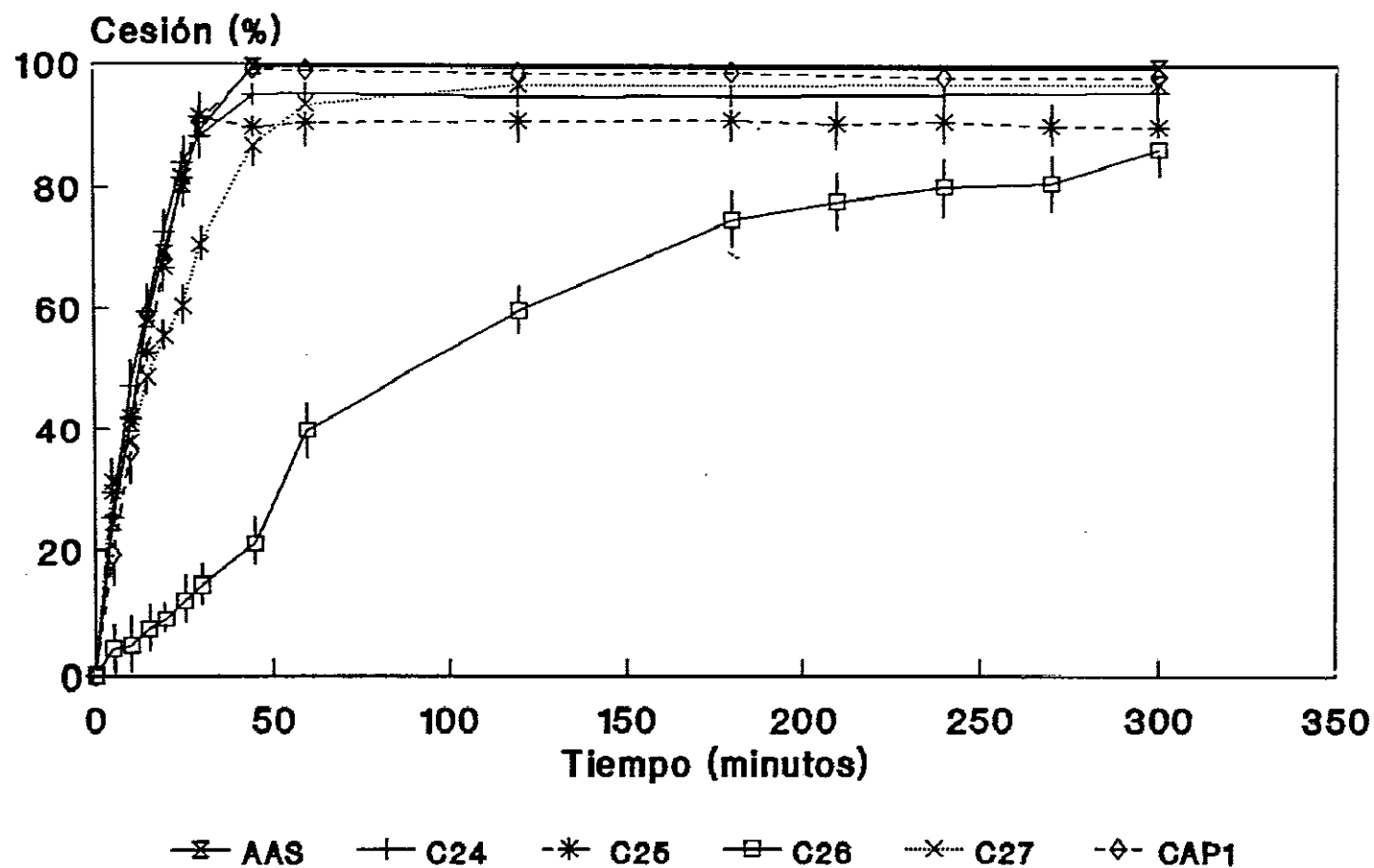


Figura 17. Estudio de velocidad de disolución a pH 6,8 de las formulaciones C24, C25, C26, C27 y CAP1 frente a AAS patrón.

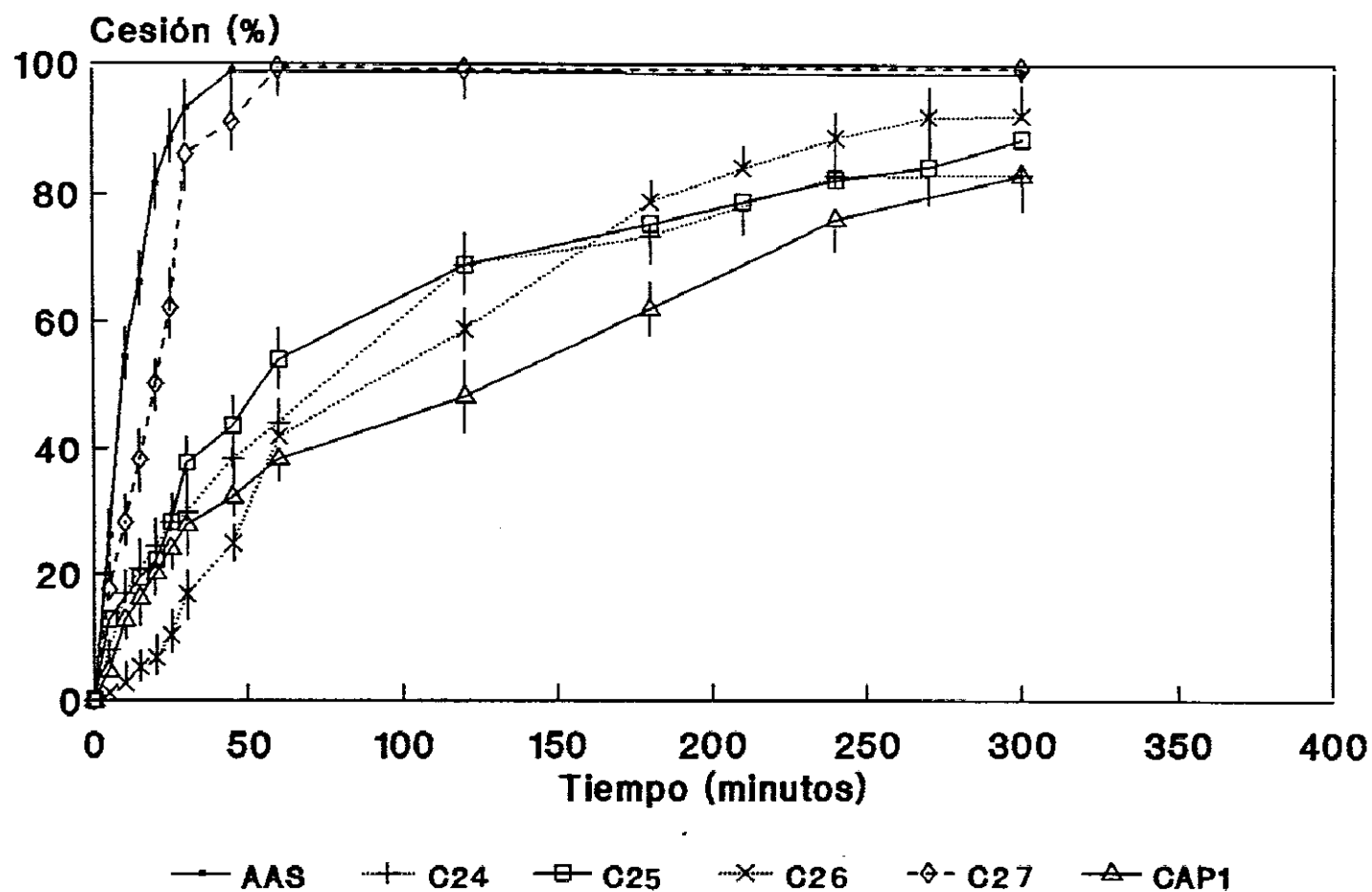


Figura 18. Estudio de velocidad de disolución a pH 1,4 de las formulaciones C24, C25, C26, C27 y CAP1 frente a AAS patrón.

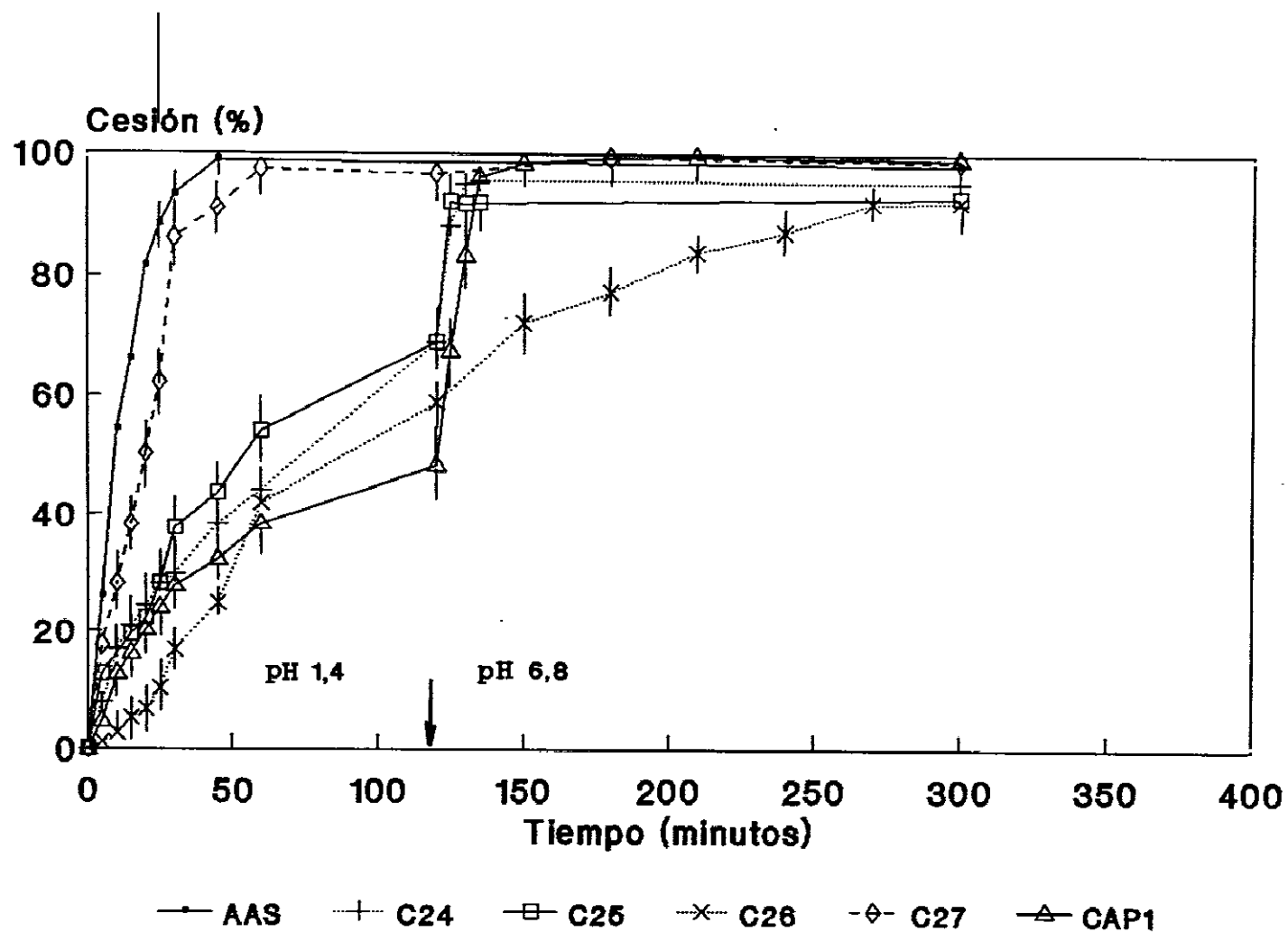


Figura 19. Estudio de velocidad de disolución en medio con cambio de pH de las formulaciones C24, C25, C26, C27 y CAP1 frente a AAS patrón.

FORMULACION	pH	TD50%	TD80%
AAS	6,8	13 min	25 min
C24	6,8	15 min	23 min
C25	6,8	5 min	15 min
C26	6,8	1 h 45 min	4 h
C27	6,8	17 min	42 min
CAP1	6,8	13 min	25 min
AAS	1,4	8 min	20 min
C24	1,4	1 h 15 min	4 h
C25	1,4	1 h 20 min	3 h 30 min
C26	1,4	1 h 45 min	2 h
C27	1,4	20 min	30 min
CAP1	1,4	2 h	4 h 30 min
AAS	1,4 - 6,8	8 min	
C24	1,4 - 6,8	1 h 15 min	2 h 5 min
C25	1,4 - 6,8	1 h 20 min	2 h 5 min
C26	1,4 - 6,8	1 h 45 min	2 h 35 min
C27	1,4 - 6,8	20 min	30 min
CAP1	1,4 - 6,8	2 h 5 min	2 h 10 min

Tabla 16. Valores experimentales de los tiempos de disolución 50 y 80% en las formulaciones C24, C25, C26, C27 y CAP1 en distintos medios de ataque.

Estudio físico de la compresión de las distintas formulaciones.

La tabla 17 muestra los resultados de las cuatro formulaciones estudiadas. Los cristales de AAS (formulación C4), los pelets (formulación C5) y la formulación mezcla de pelets recubiertos junto con Avicel (formulación C14) tienen unas características de compresión parecidas, mientras que la formulación de pelets recubiertos (formulación C10) es bastante diferente a las anteriores.

Según Leigh y col (1967) el AAS tiene un comportamiento cuando se experimenta su compresión de tipo elástico. Este efecto se puede ver con el valor de recuperación elástica. Las formulaciones C4, C5 y C14 tienen un valor de recuperación elástico mayor de 10, siendo este valor inferior a 10 en la formulación C10.

La eficacia lubricante de la formulación C10 contrasta con los valores de las otras formulaciones. Aunque esta se puede mejorar mediante el empleo de lubricantes, en estos ensayos no se utilizó ninguno para evitar posibles modificaciones en las características de compresibilidad (Parrot, 1981).

La tabla 18 muestra las características de los comprimidos obtenidos. Las diferencias de peso de los comprimidos se deben a diferencias en la densidad aparente de las distintas formulaciones. Los comprimidos obtenidos de las formulaciones C10 y C14 presentan características similares. La diferencia más acusada es el valor de resistencia a su fractura obtenida

	FORMULACION			
	C4	C5	C10	C14
Fuerza máxima del punzón superior (KN)	8,6	11,1	3,7	9,6
Fuerza máxima del punzón inferior (KN)	7,2	9,6	2,4	8,5
Recuperación elástica (RE)	11,3	11,9	6,0	13,6
Eficacia del lubrificante (EL)	0,84	0,87	0,65	0,88

Tabla 17. Parámetros de compresión para distintas formulaciones.

FORMULACION

	C4	C5	C10	C14
Peso (mg)	705,4 ± 16,1	593,8 ± 8,0	494,4 ± 9,1	493,4 ± 15,3
Altura (mm)	4,0 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,1 ± 0,1
Resistencia a la fractura	8,7 ± 0,7	10,8 ± 0,4	13,9 ± 1,3	> 15 *

Tabla 18. Características de peso, altura y resistencia a la fractura de distintas formulaciones de comprimidos.

Nota *, la resistencia a la fractura de la formulación C14 se salió de escala.

con la formulación C14. Esto probablemente se debe a la utilización de Avicel y otros excipientes de compresión directa que aumenta la resistencia a la fractura de comprimidos. Resultados similares han sido descritos por Saleh y Stamm (1988).

La figura 20 muestra los resultados de la representación de las curvas de fuerzas de compresión/desplazamiento de las cuatro formulaciones estudiadas. La formulación C10 es la que tiene unas características mas diferenciadas frente a las otras formulaciones estudiadas. Este comportamiento diferente también se puso de manifiesto cuando se representaron las fuerzas de compresión a distintos tiempos (figura 21).

La formulación C10 parece tener un comportamiento más plástico que las otras formulaciones. Esta formulación (C10) necesita una menor fuerza de compresión para deformarse. Posiblemente este hecho se debe a que se produce una fusión entre las membranas acrílicas que se encuentran en la superficie de los pelets.

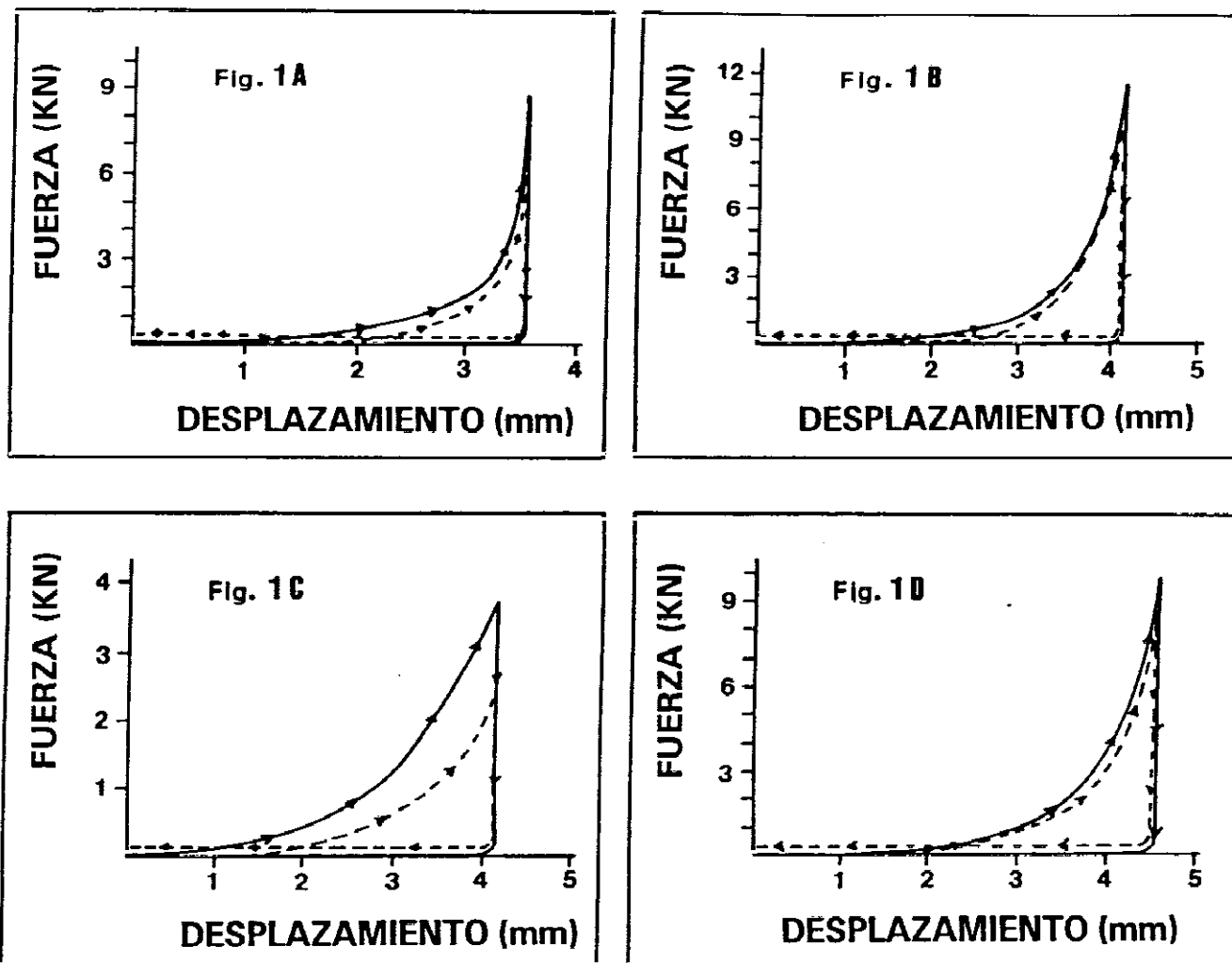


Figura 20. Representación gráfica de las fuerzas de compresión y desplazamientos de las cuatro formulaciones estudiadas.

Fig. 1A - Formulación C4; Fig. 1B - Formulación C5; Fig. 1C - Formulación C14; Fig. 1D - Formulación C10

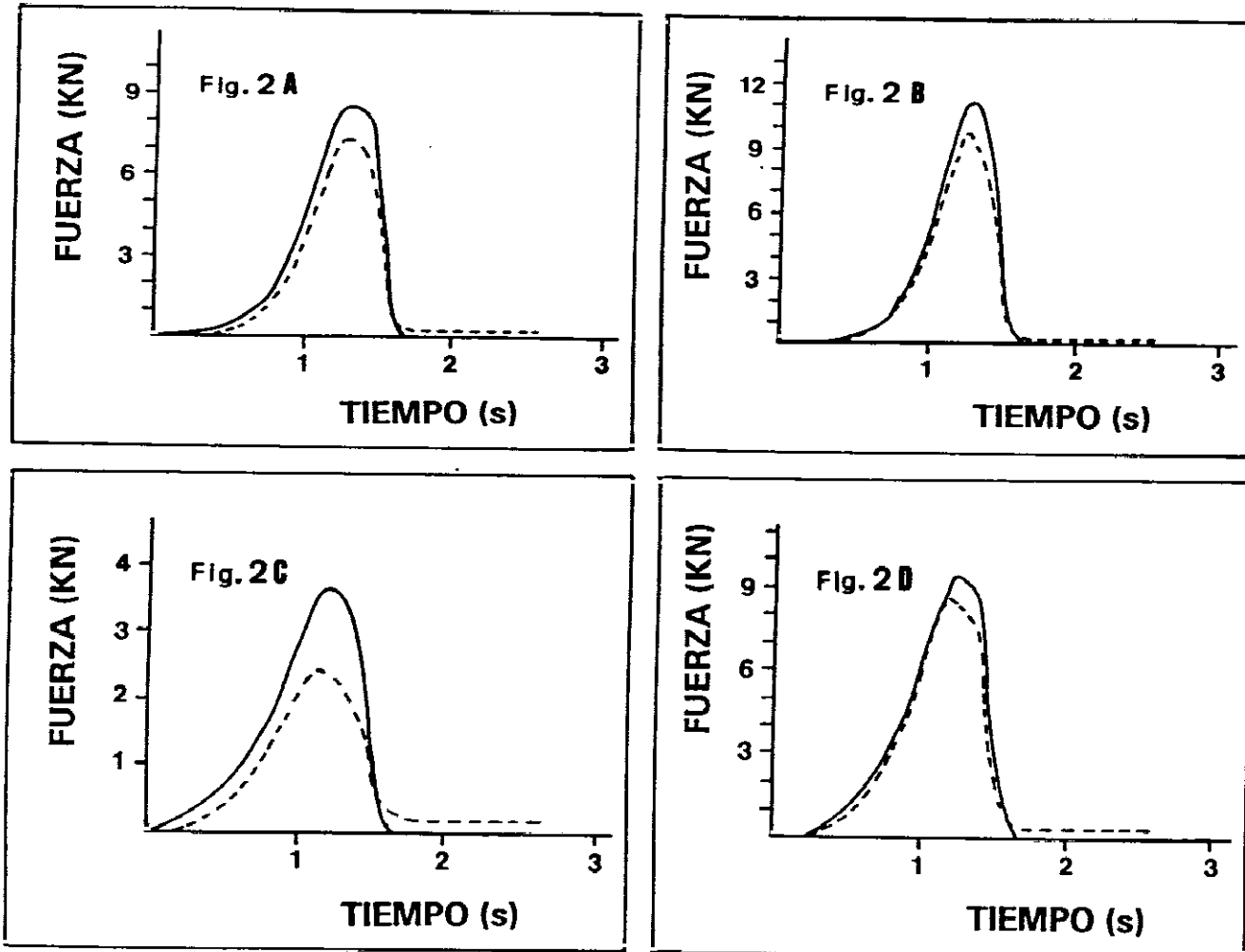


Figura 21. Representación gráfica de las fuerzas de compresión y tiempo de las cuatro formulaciones estudiadas. La fuerza ejercida por el punzón superior se representa en línea continua y la fuerza transmitida al punzón inferior se dibuja en la línea discontinua.

Fig. 1A - Formulación C4; Fig. 1B - Formulación C5; Fig. 1C - Formulación C14; Fig. 1D - Formulación C10.

3. Estudio de estabilidad.

Los resultados de los ensayos de estabilidad así como su ajuste a una cinética de degradación de orden cero o uno se pueden ver en las tablas 19-24, según la formulación estudiada.

A continuación se relaciona el orden de reacción más probable utilizando el criterio estadístico de la "t" de Student. Los resultados se muestran en las tablas 25 y 26.

El periodo de validez se determina en función del orden de degradación, como se muestra en la tabla 27.

Como se puede apreciar en las tablas, en la mayoría de los casos la cinética de la reacción se asemeja a un orden cero, aunque debido a los pequeños porcentajes de degradación (<30%) no es fácil determinar el orden de la reacción (Connors, 1986).

El orden de estabilidad de las distintas formulaciones estudiadas sería:

AAS > C10 > P10 > P4 > C24 > DS2

De estos resultados se deduce que el Eudragit, en nuestras condiciones de estudio, no se puede considerar como un excipiente favorecedor de la estabilidad.

t (meses)	% AS	ln AS
0	0,081 ± 0,003	- 2,513
1,6	0,087 ± 0,004	- 2,442
3	0,091 ± 0,004	- 2,397
6	0,102 ± 0,006	- 2,283
9	0,114 ± 0,007	- 2,172
12	0,121 ± 0,008	- 2,112
21	0,161 ± 0,014	- 1,826

Para una cinética de orden cero:

$$\% \text{ AS} = 0,799 + 0,00375 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9974$$

$$r^2 = 0,9948$$

Para una cinética de orden uno:

$$\ln \% \text{ AS} = \ln 0,08275 + 0,0323 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9974$$

$$r^2 = 0,9948$$

Tabla 19. Estudio experimental de estabilidad a temperatura ambiente (25°C) para el AAS materia prima.

t (meses)	% AS	ln AS
0	0,130 ± 0,006	- 2,0402
1	0,192 ± 0,012	- 1,6502
3	0,252 ± 0,018	- 1,3783
6	0,358 ± 0,024	- 1,0272
9	0,464 ± 0,024	- 0,7679
16	0,709 ± 0,037	- 0,3439
21	0,926 ± 0,061	- 0,0769

Para una cinética de orden cero:

$$\% \text{ AS} = 0,1391 + 0,0367 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9991$$

$$r^2 = 0,9981$$

Para una cinética de orden uno:

$$\ln \% \text{ AS} = \ln 0,1776 + 0,0859 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9660$$

$$r^2 = 0,9331$$

Tabla 20. Estudio experimental de estabilidad a temperatura ambiente (25°C) para pelets de AAS (P10).

t (meses)	% AS	ln AS
0	0,112 ± 0,005	- 2,1890
0,66	0,139 ± 0,005	- 1,9733
3	0,282 ± 0,007	- 1,2658
6	0,442 ± 0,009	- 0,8164
9	0,620 ± 0,011	- 0,4780
15	0,992 ± 0,014	- 0,0080
21	1,301 ± 0,021	0,2631

Para una cinética de orden cero:

$$\% \text{ AS} = 0,1067 + 0,0575 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9996$$

$$r^2 = 0,9993$$

Para una cinética de orden uno:

$$\ln \% \text{ AS} = \ln 0,1632 + 0,1137 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9472$$

$$r^2 = 0,8972$$

Tabla 21. Estudio experimental de estabilidad a temperatura ambiente (25°C) para pelets de AAS (P4).

t (meses)	% AS	ln AS
0	1,089 ± 0,106	0,0853
1	1,369 ± 0,154	0,3141
1,5	1,659 ± 0,168	0,5062
6	2,499 ± 0,223	0,9159
9	3,226 ± 0,238	0,1712
16	4,811 ± 0,278	1,5709
21	6,272 ± 0,295	1,8361

Para una cinética de orden cero:

$$\% \text{ AS} = 1,1335 + 0,2383 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9765$$

$$r^2 = 0,9983$$

Para una cinética de orden uno:

$$\ln \% \text{ AS} = \ln 1,3505 + 0,0788 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9765$$

$$r^2 = 0,9535$$

Tabla 22. Estudio experimental de estabilidad a temperatura ambiente (25°C) para una dispersión sólida de AAS (DS2).

t (meses)	% AS	ln AS
0	0,163 ± 0,008	- 1,8140
1	0,198 ± 0,012	- 1,6195
3	0,272 ± 0,032	- 1,3019
6	0,355 ± 0,021	- 1,0356
9	0,439 ± 0,027	- 0,8232
15	0,605 ± 0,029	- 0,5025
21	0,786 ± 0,072	- 0,2399

para una cinética de orden cero:

$$\% \text{ AS} = 0,1731 + 0,0292 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9994$$

$$r^2 = 0,9989$$

Para una cinética de orden uno:

$$\ln \% \text{ AS} = \ln 0,1994 + 0,0718 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9699$$

$$r^2 = 0,9408$$

Tabla 23. Estudio experimental de estabilidad a temperatura ambiente (25° C) para comprimidos de pelets de AAS (C10).

t (meses)	% AS	ln AS
0	0,111 ± 0,007	- 2,1982
1	0,172 ± 0,009	- 1,7603
3	0,281 ± 0,017	- 1,2694
6	0,443 ± 0,027	- 0,8142
9	0,606 ± 0,032	- 0,5009
15	0,931 ± 0,040	0,0715
21	1,370 ± 0,072	0,3148

Para una cinética de orden cero:

$$\% \text{ AS} = 0,0995 + 0,0585 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9981$$

$$r^2 = 0,9962$$

Para una cinética de orden uno:

$$\ln \% \text{ AS} = \ln 0,1699 + 0,1110 \text{ t (meses)}$$

$$n = 7$$

$$r = 0,9539$$

$$r_2 = 0,9100$$

Tabla 24. Estudio experimental de estabilidad a temperatura ambiente (25° C) para comprimidos de pelets de AAS (C24).

FORMULACION	CINETICA DE DEGRADACION	S^2	PROPORCIONALIDAD (sesgo)	LINEALIDAD (S_b rel)
AAS (Merck)	Orden 0	$4,886 \cdot 10^{-6}$	$0,0799 \pm 0,003$	3,27%
	Orden 1	$3,549 \cdot 10^{-4}$	$- 2,4919 \pm 0,018$	3,27%
P10	Orden 0	$1,888 \cdot 10^{-4}$	$0,1390 \pm 0,019$	1,93%
P4	Orden 0	$1,745 \cdot 10^{-4}$	$0,1067 \pm 0,006$	1,20%
DS2	Orden 0	$1,468 \cdot 10^{-2}$	$1,1335 \pm 0,170$	2,56%
COMPRIMIDOS				
C10	Orden 0	$3,397 \cdot 10^{-4}$	$0,1713 \pm 0,026$	3,32%
C24	Orden 0	$9,400 \cdot 10^{-4}$	$0,0995 \pm 0,044$	2,76%

Tabla 25. Determinación de la varianza experimental (S^2), test de proporcionalidad (sesgo) y linealidad (S_b rel) para distintas formulaciones.

FORMULACIONES

	AAS	P10	P4	C10	C24
--	-----	-----	----	-----	-----

Orden 0

r	0,9974	0,9991	0,9996	0,9994	0,9981
z	3,32205	3,85291	4,30949	5,05564	3,47905

Orden 1

r	0.9974	0.9660	0,9472	0,9699	0,9539
z	3,32205	2,02870	1,80409	2,09060	1,87340

S I G N I F I C A C I O N	Sz	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	"t"		5,7687	9,3743	6,2139	5,0775
			Orden 0	Orden 0	Orden 0	Orden 0
		N.S. (p>0,01)	S (p<0,01)	S (p<0,01)	S (p<0,01)	S (p<0,01)

Tabla 26. Selección del orden cinético de degradación para las distintas formulaciones sometidas a estabilidad ambiente (25° C) mediante un test estadístico "t".

FORMULACION	CINETICA DE DEGRADACION	% AS-LIBRE LIMITE	St (% AS)	INTERVALO ESTABILIDAD (MESES) (P<0,025)
AAS (Merck)	Orden 0	0,1	0,1655	5,34 + 0,425
		0,3	1,9073	58,62 + 4,904
		3	25,4231	777,88 + 65,36
		6	51,5511	1577,88 + 132,53
	Orden 1	0,1	0,2132	5,86 + 0,548
		0,3	1,0117	39,89 + 2,601
		3	2,9531	111,20 + 7,592
		6	5,9881	132,66 + 15,390
	P10	0,3	0,0890	4,38 + 0,229
		3	1,5060	77,87 + 3,873
		6	3,0810	159,53 + 7,922
P4	Orden 0	0,3	0,3930	3,36 + 0,101
		3	0,6040	50,35 + 1,553
		6	1,2314	102,55 + 3,166
DS2	Orden 0	3	0,3059	3,83 + 0,529
		6	0,5287	20,42 + 1,359
C10	Orden 0	0,3	0,1557	4,34 + 0,400
		3	3,2235	96,75 + 8,288
C24	Orden 0	0,3	0,0368	4,43 + 0,095
		3	1,3626	49,58 + 3,503

Tabla 27. Periodo de validez, expresado como intervalo de estabilidad (meses), de las distintas formulaciones en función de la cinética de reacción, del porcentaje límite permitido de AS libre. Clave: St (% AS) es la desviación estandard del periodo de validez.

El Eudragit está formado por copolímeros del ácido metacrílico y según su estructura química se dividen en:

-Eudragit E. Copolímeros de carácter catiónico a base de metacrilato de dimetilaminoetilo y ésteres neutros del ác. metacrílico de peso molecular medio 150.000.

-Eudragit L. Copolímeros de carácter aniónico a base de ácido metacrílico y metacrilatos de metilo de peso molecular medio de 135.000.

-Eudragit RS. Copolímeros de acrilatos y metacrilatos, con un bajo contenido en grupos amonio cuaternario, en forma de sal, responsable de su permeabilidad. Peso molecular medio 150.000.

En el caso de las dispersiones sólidas su poca estabilidad ha sido comentada por otros autores (El-Banna, 1978) y parece deberse a su tendencia a la captación de humedad, como se comprobó en los ensayos de captación de humedad realizados a distintas humedades relativas. En la tabla 28 y figura 22 se muestran los resultados de captación de humedad de las tres formulaciones estudiadas. Como se puede apreciar cuanto mayor es la tendencia a la captación de humedad (higroscopicidad) menor es la estabilidad de dicha formulación.

% H.R.	50	68	95
AAS	0,050	0,062	0,100
P8	0,272	0,432	1,472
DS2	2,378	3,275	7,829

Tabla 28. Humedad relativa (% p/p) en el equilibrio para distintas formulaciones conteniendo AAS, conservadas en ambiente con distintas humedades relativas.

Humedad relativa

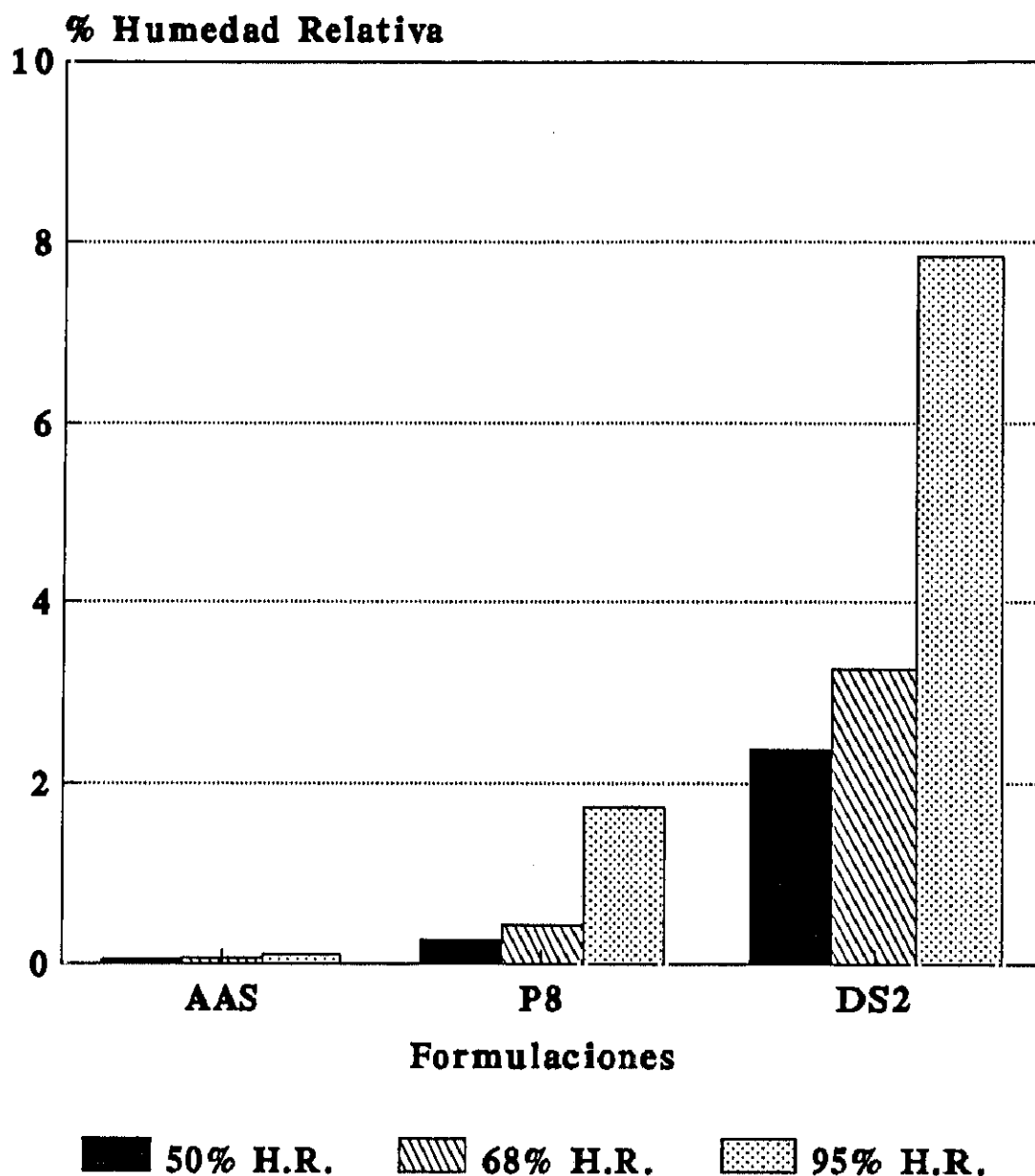


Figura 22. Resultados de captación de humedad en el equilibrio (25^o C) a tres humedades relativas diferentes (50, 68 y 95%) de las formulaciones AAS, P8 y DS2.

La estabilidad para tres formulaciones de pelets conteniendo un 13 % de los tres copolímeros del ácido metacrílico estudiados (E, L y RS) se muestra en la tabla 29.

<u>Clave</u>	<u>Carácter del polímero</u>
Eudragit E 13%	Catiónico
Eudragit L 13%	Aniónico
Eudragit RS 13%	Inerte

<u>Clave</u>	<u>Estabilidad ambiente a los 18 meses</u> <u>% AS libre</u>
P1	1,14 ± 0,14
P4	0,78 ± 0,1
P8	0,54 ± 0,08
AAS	0,15 ± 0,05

Tabla 29. Porcentaje AS libre degradado después de 18 meses a temperatura ambiente (25°C) de pelets conteniendo un 13% de ácido metacrílico de distinta naturaleza.

Se observa una mayor degradación del AAS en los pelets recubiertos con los copolímeros de ácido metacrílico E que con el L, que se explica por existir una mayor hidrólisis del AAS en medio alcalino que en medio ácido (Connors, 1986). La mayor estabilidad del copolímero del ácido acrílico RS, puede deberse a su carácter neutro y a una menor permeabilidad al agua.

4. Gastrototoxicidad.

Los resultados de toxicidad de ulceraciones de las cinco formulaciones estudiadas según el criterio de Morris y de Rainsford se representan en las figuras 23 y 24, respectivamente.

Debido a que varias de las formulaciones estudiadas presentan un valor máximo según la escala de Morris, para el tratamiento estadístico utilizamos el criterio de Rainsford.

En las figuras 25-29 se muestran los estómagos que tuvieron mayor y menor número de lesiones en cada lote.

La tabla 30 muestra los resultados del estudio estadístico de las lesiones según el índice de Rainsford.

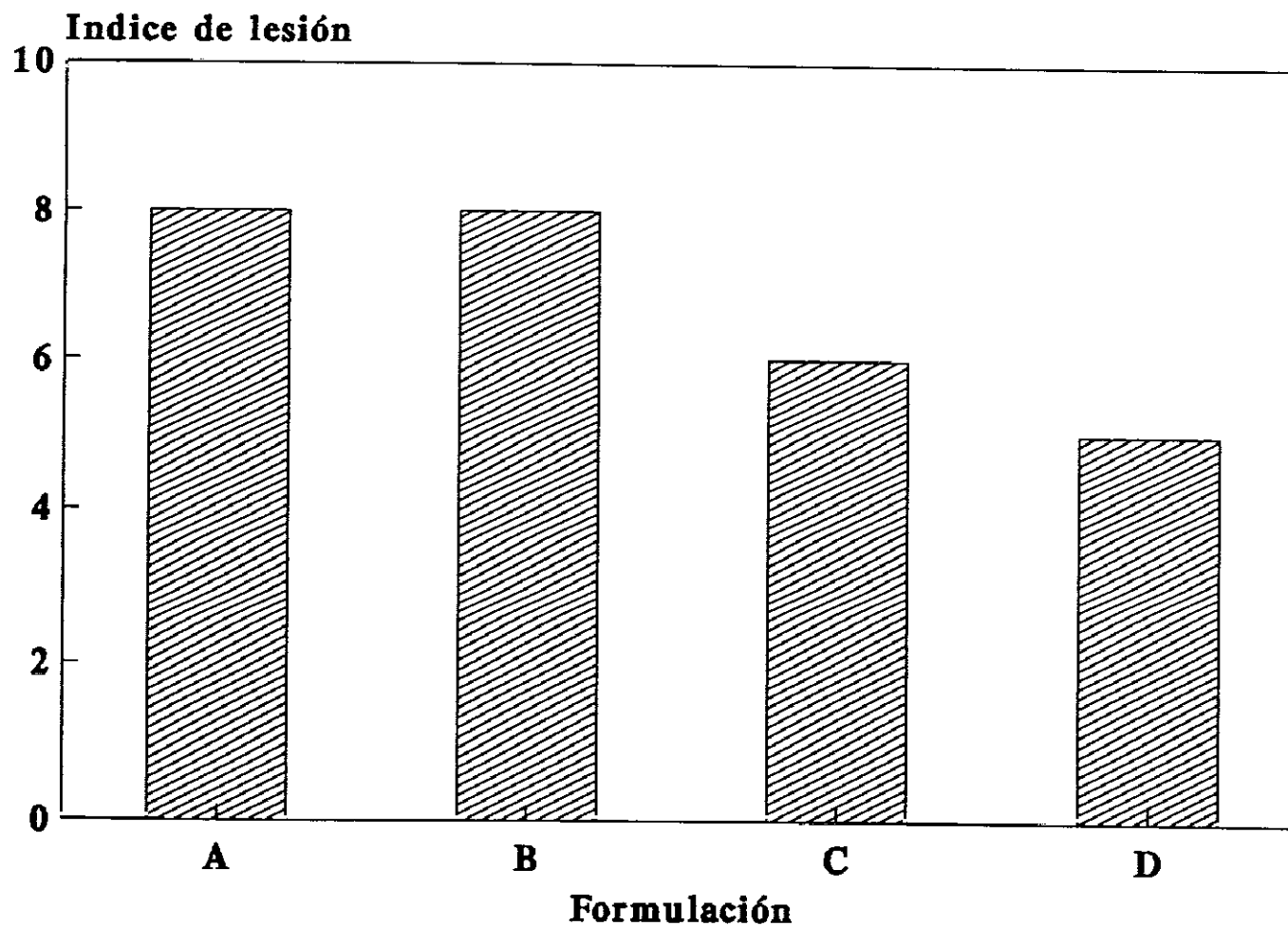


Figura 23. Valores medios y formulación estandar de lesiones gástricas producidas por las distintas formulaciones evaluadas según la escala de Morris. Clave: A- AAS ($400 < 0 < 500 \mu\text{m}$), B- AAS ($50 < 0 < 200 \mu\text{m}$), C- Fórmula G1 y D AAS ($400 < 0 < 500 \mu\text{m}$) con bisabolol (al 2% p/p).

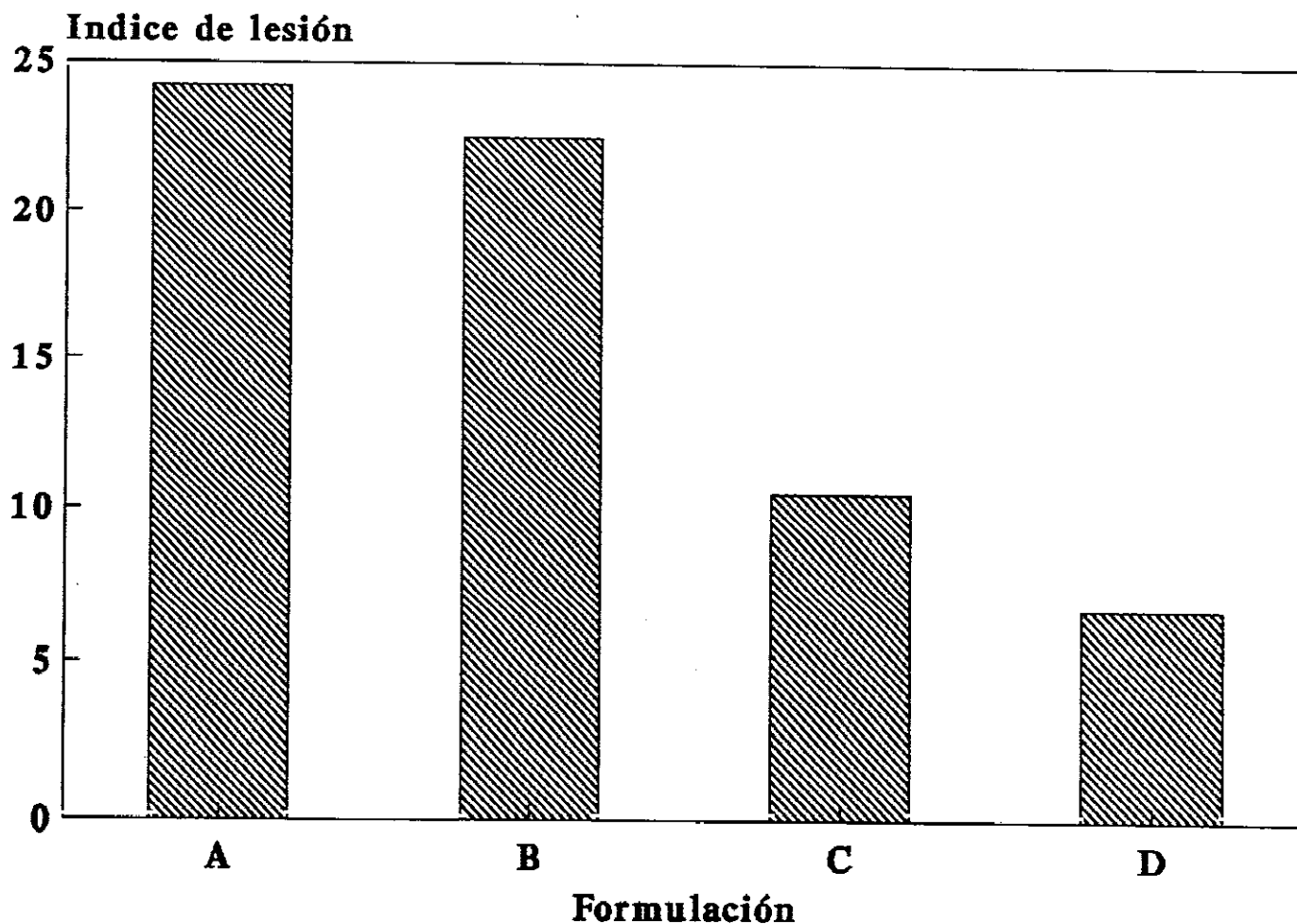


Figura 24. Valores medios y formulación estandar de lesiones gástricas producidas por las distintas formulaciones evaluadas según la escala de Rainsford. Clave: A- AAS ($400 < 0 < 500 \mu\text{m}$), B- AAS ($50 < 0 < 200 \mu\text{m}$), C- Fórmula G1 y D AAS ($400 < 0 < 500 \mu\text{m}$) con bisabolol (al 2% p/p).

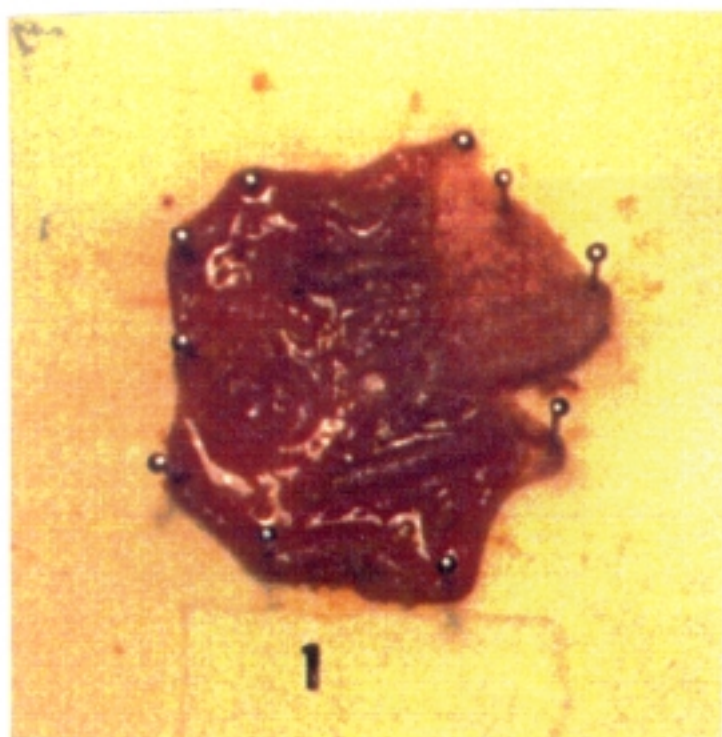


Figura 25. Ejemplo de estómago del lote control (número 1)

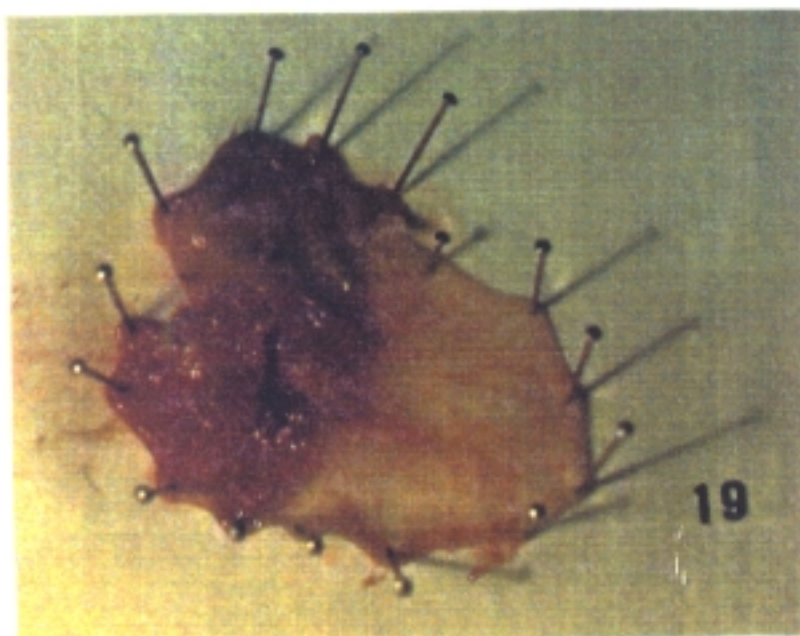
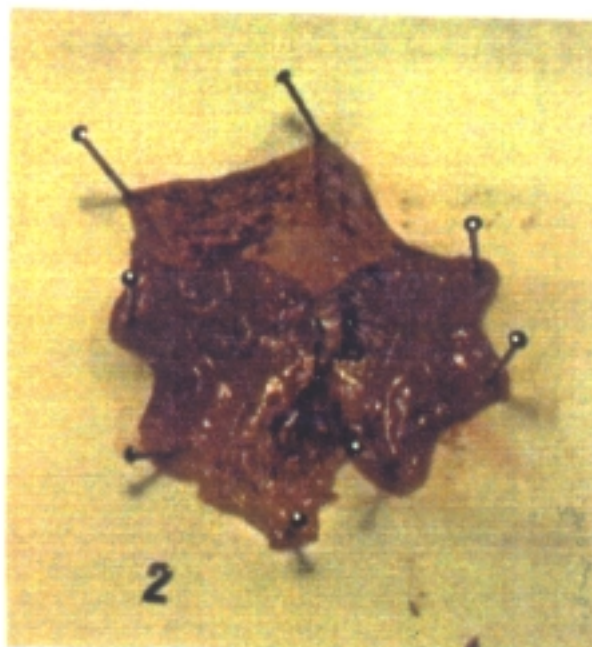


Figura 26. Estómagos con mayor (número 2) y menor (número 19) número de lesiones del lote de ratas al que se administra la formulación A.

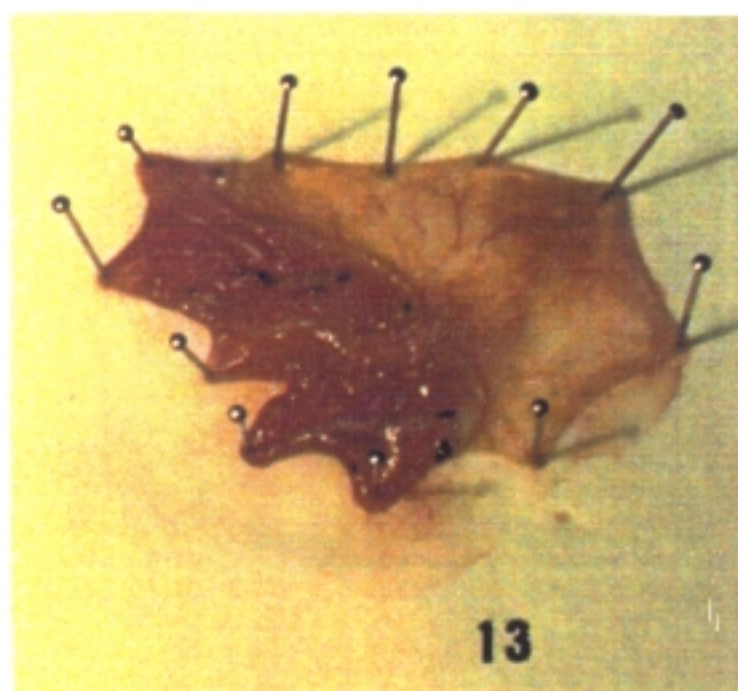
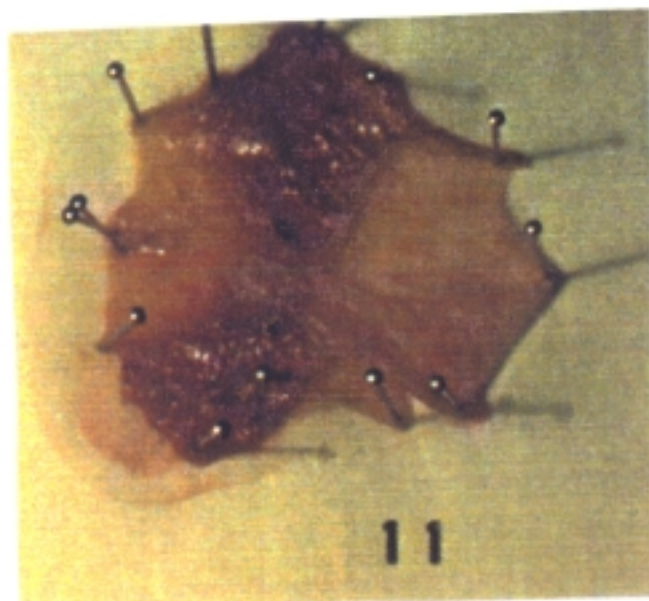


Figura 27. Estómagos con mayor (número 11) y menor (número 13) número de lesiones del lote de ratas al que se administra la formulación B.

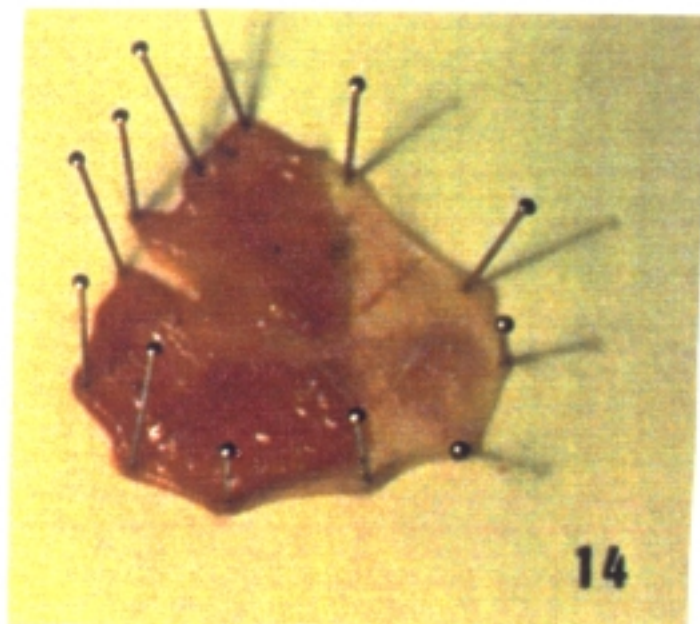
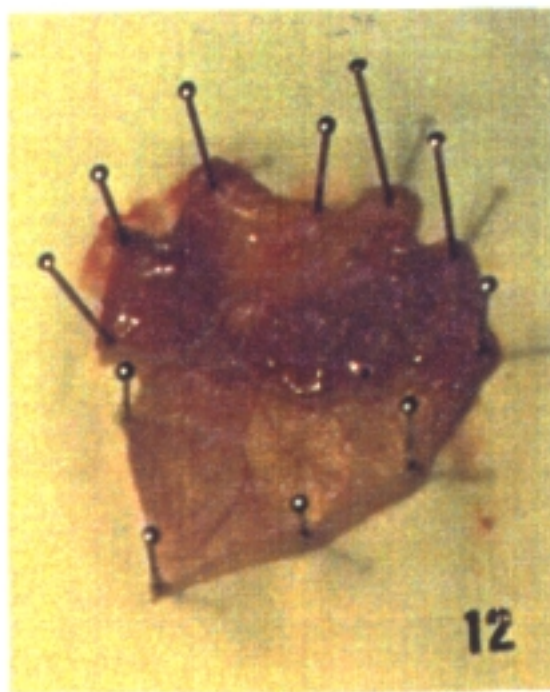


Figura 28. Estómagos con mayor (número 12) y menor (número 14) número de lesiones del lote de ratas al que se administra la formulación C.

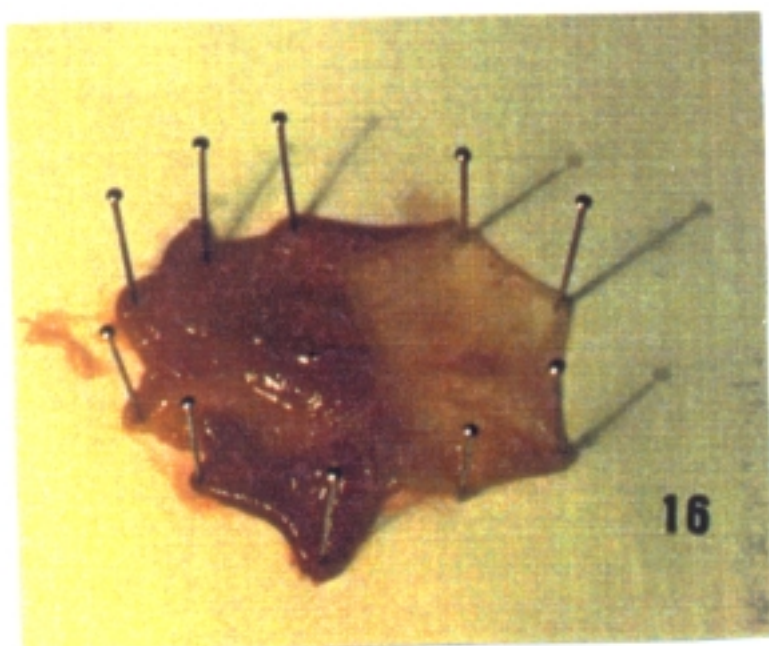
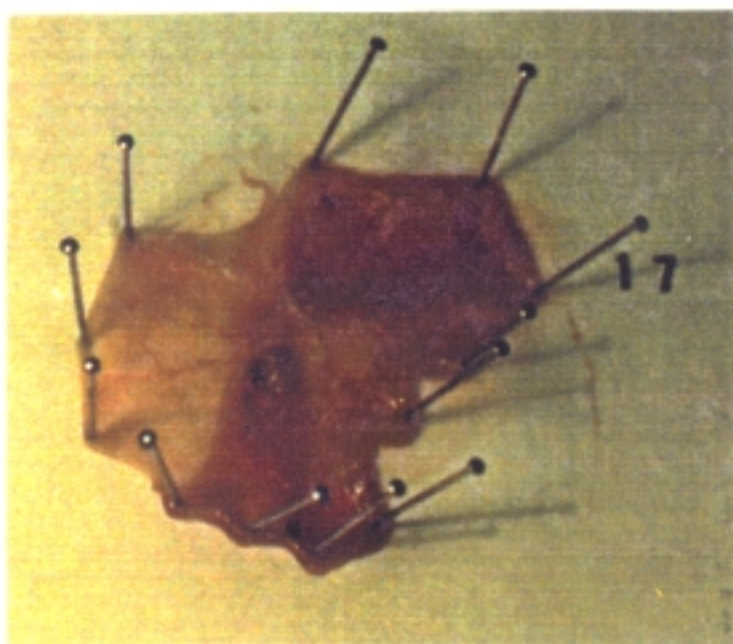


Figura 29. Estómagos con mayor (número 17) y menor (número 16) número de lesiones del lote de ratas al que se administra la formulación D.

FORMULACION	ESTUDIO ESTADISTICO
A - B	N.S. ($p < 0,05$)
A - C	S ($p < 0,05$)
A - D	S ($p < 0,01$)
B - C	S ($p < 0,01$)
C - D	N.S. ($p < 0,05$)

Tabla 30. Estudio estadístico mediante un análisis de varianza (ANOVA) de las lesiones gástricas producidas por las distintas formulaciones evaluadas según la escala de Rainsford. Clave: S= Significativo, NS= No Significativo, P= probabilidad de error.

La irritabilidad del AAS se relaciona con la velocidad de disolución (Rainsford, 1984). En la figura 30 se muestra la velocidad de disolución a pH 4,5 (aparato de disolución, método II, USP XXII, 1990) de las formulaciones A, B y C.

Como era de suponer la velocidad de cesión "in vitro" depende del tamaño de partícula (Richard, 1988) (Colomb y col, 1990). Aunque cristales de AAS de tamaño 0,4-0,5 mm tienen una velocidad de cesión mayor que cristales de 0,05-0,2 mm, este efecto no es estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Se pudo observar que cuando el tamaño es menor de 0,2 mm algunas de estas partículas se humectan con dificultad y flotan. El problema de la humectación parece estar relacionado con el tamaño de partícula y cuanto menor es el tamaño de las mismas más difíciles son de humectar (Ford, 1988). Cuando se granulan las partículas (fórmula C) se mejora la humectación. La formulación C tiene una velocidad de cesión más rápida que las otras dos formulaciones.

En nuestro caso no se encontraron diferencias significativas en la irritabilidad gástrica producida por cristales de tamaño 0,4-0,5 (formulación A) y 0,05-0,2 mm (formulación B). sin embargo, la formulación C si tiene una menor toxicidad ($p < 0,05$) que las formulaciones de los cristales de AAS (formulaciones A y B). Este efecto se debe probablemente a la mayor velocidad de disolución.

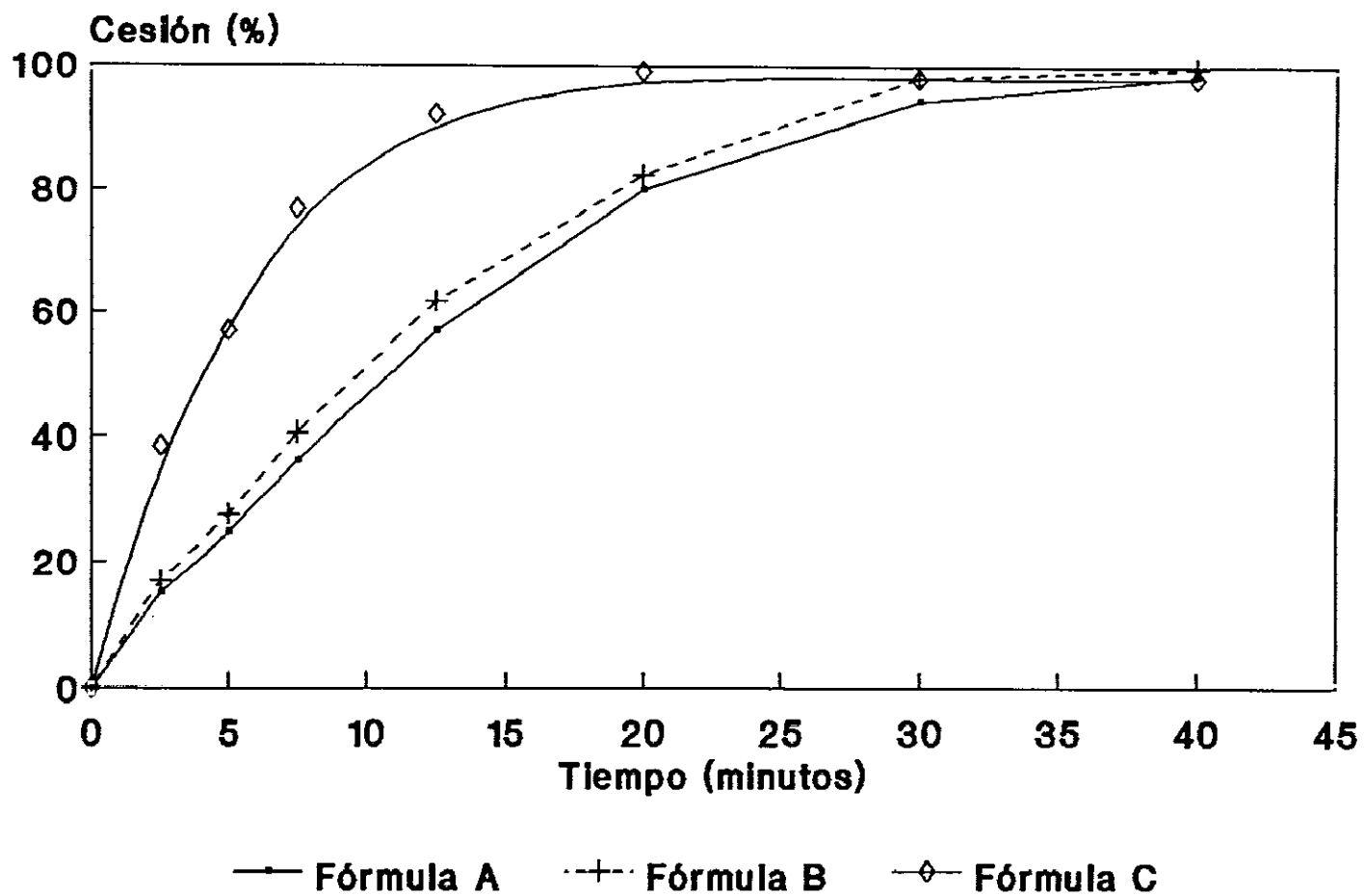


Figura 30. Ensayo de velocidad de disolución a pH 4,5 para las formulaciones A, B y C.

El efecto protector del α -bisabolol se estudia con la formulación D y se puede comparar con la formulación A. Como se puede ver en la tabla 30 existe una diferencia significativa ($p < 0,01$). El efecto protector del α -bisabolol se puede deber a distintos mecanismos.

-Algunos aceites pueden ser útiles como agentes protectores al modificar el carácter hidrofóbico en la mucosa gástrica (Lichtenberger y col, 1990). Quizá el α -bisabolol tenga una acción parecida.

-Otro posible mecanismo de protección se debe a su actividad antioxidante que pudiera neutralizar la formación de radicales libres. Szabo y col (1981) y Piham y col (1987) han demostrado el efecto de los radicales libres en la formación de úlceras y la acción de algunos antioxidantes en el tratamiento de úlceras.

-La actividad antipeptica del α -bisabolol (Isaac y Thiemer, 1985) también puede ser útil para disminuir el efecto ulcerogénico causado por un posible reflujo de pepsina al estómago.

5. Biodisponibilidad relativa.

En los ensayos de biodisponibilidad relativa se estudian seis formulaciones. La velocidad de cesión in vitro de estas seis formulaciones se muestra en la figura 31.

En un primer ensayo se estudiaron los valores de excreción urinaria de salicilatos totales y libres (según el método de Trinder) y niveles de ácido salicílico (HPLC) después de la administración en seis voluntarios de la formulación A.

Los valores medios de velocidad de excreción y cantidad total excretada de forma acumulada para la formulación A se muestran en las figuras 32 y 33.

A continuación se realizó un análisis de varianza entre los valores de las cantidades totales acumuladas en 24 horas. Como es lógico existe una gran diferencia significativa ($P < 0.01$) y son mayores cuando se analizan salicilatos totales (método Trinder), que cuando se analizan salicilatos libres (Trinder) o AS (método HPLC).

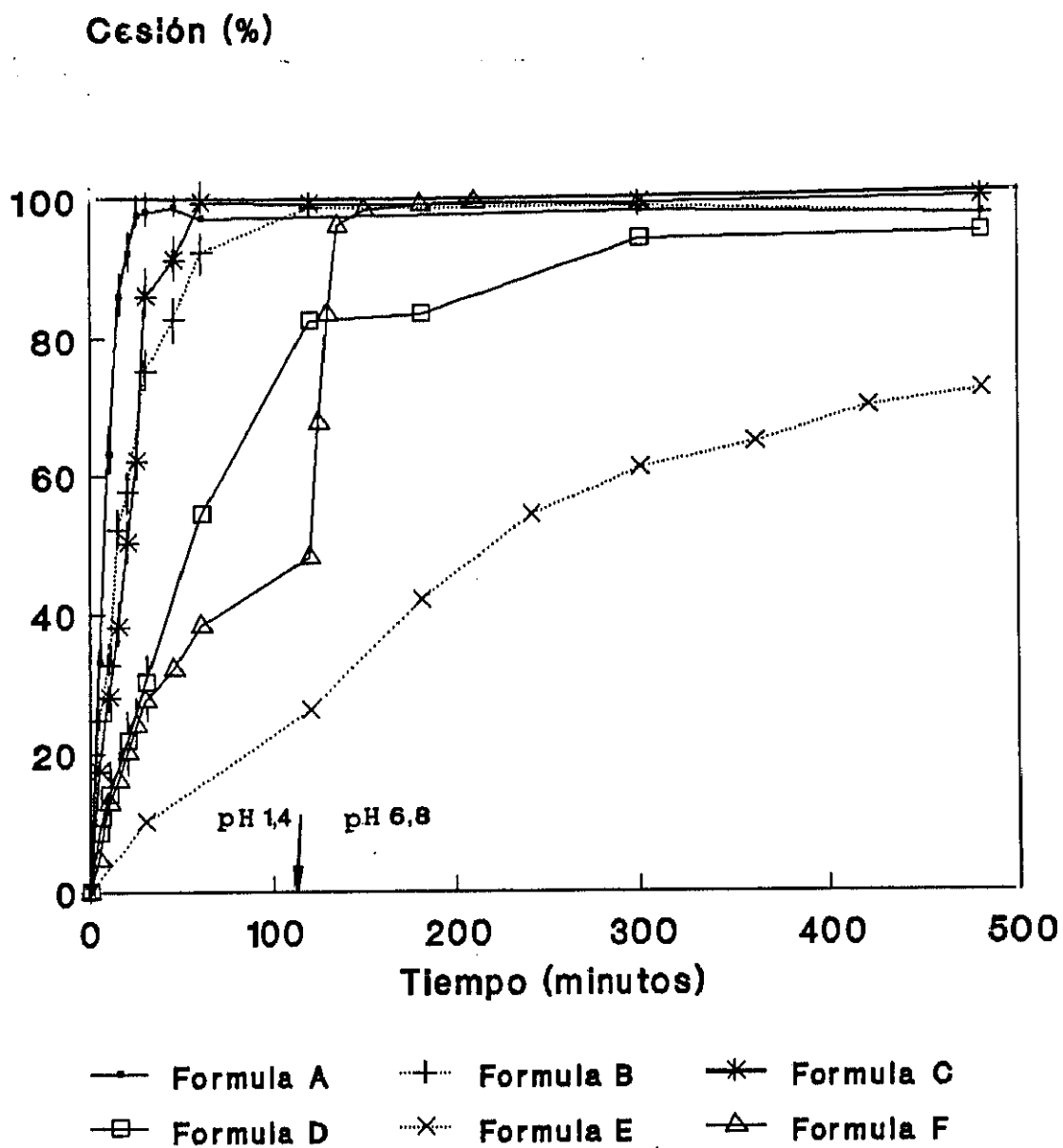


Figura 31. Velocidad de disolución con variación de pH de las seis formulaciones del ensayo.

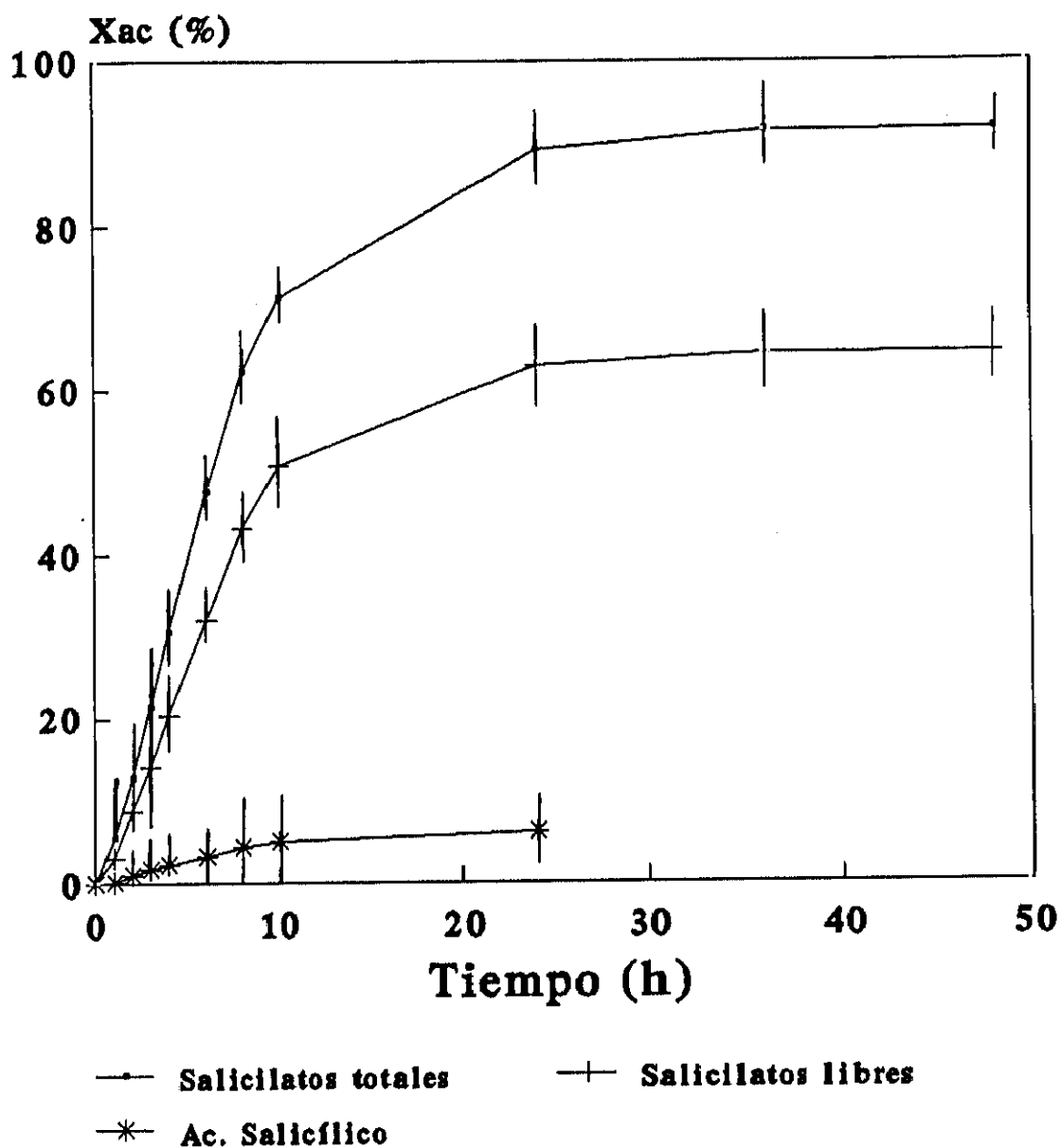


Figura 32. Valores medios de cantidades totales excretadas en forma acumulada de salicilatos totales, libres y AS, después de la administración a seis voluntarios de la formulación A.

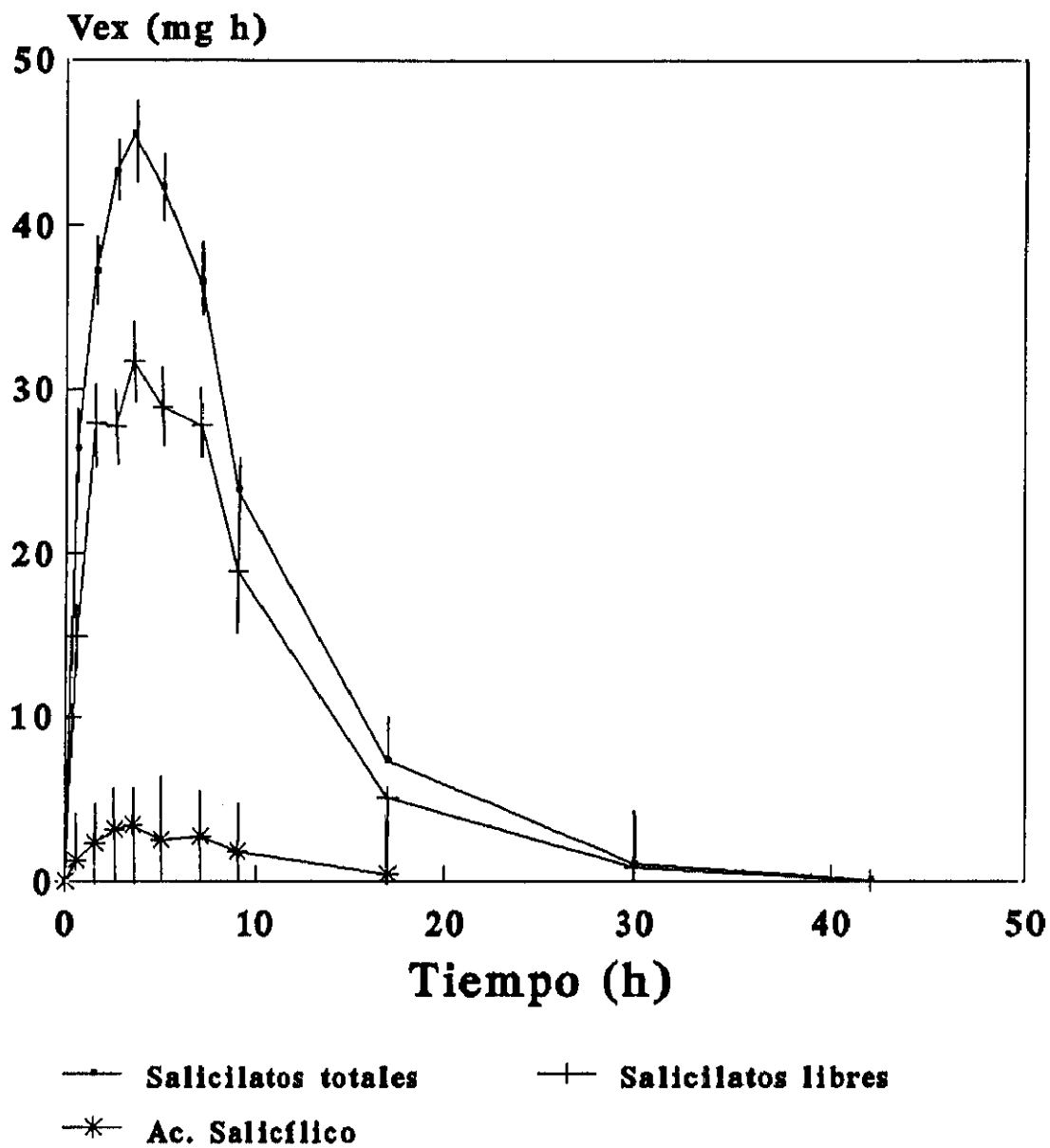


Figura 33. Valores medios de velocidad de excreción de salicilatos totales, libres y AS, después de la administración a seis voluntarios de la formulación A.

Puesto que la determinación de salicilatos por colorimetría es más rápida y sencilla que la de ácido AS por HPLC y da un resultado comparable al de otros autores, hemos elegido esta técnica de análisis para la determinación de las posibles diferencias de biodisponibilidad relativa entre las distintas formulaciones ensayadas. Por otro lado, aunque en nuestro caso los valores de desviación del AS entre los distintos voluntarios que participaron en el ensayo de la formulación A no mostraron grandes diferencias, está descrito por Levy (1965) y Gilles y col. (1986), que se puede producir una gran variabilidad en la excreción de AAS como AS libre, y puede oscilar entre un 2 y un 30% de la dosis administrada. En nuestro caso y a las 24 horas se obtienen unos valores medios de excreción de AS (HPLC) de 5.85 ± 0.61 .

Los valores de salicilatos totales y libres excretado por los distintos voluntarios después de la administración de las formulaciones A, B, C, D, E y F se representa en forma de velocidad de excreción y cantidad total excretada.

Las figuras 34-38 muestran las cantidades de AAS excretada en forma acumulada de salicilatos totales y libres después de la administración de las formulaciones B, C, D, E y F en seis voluntarios. Las figuras 39-43 muestran los valores de velocidad de excreción a distintos tiempos de salicilatos totales y libres después de la administración de las formulaciones B, C, D, E y F en seis voluntarios.

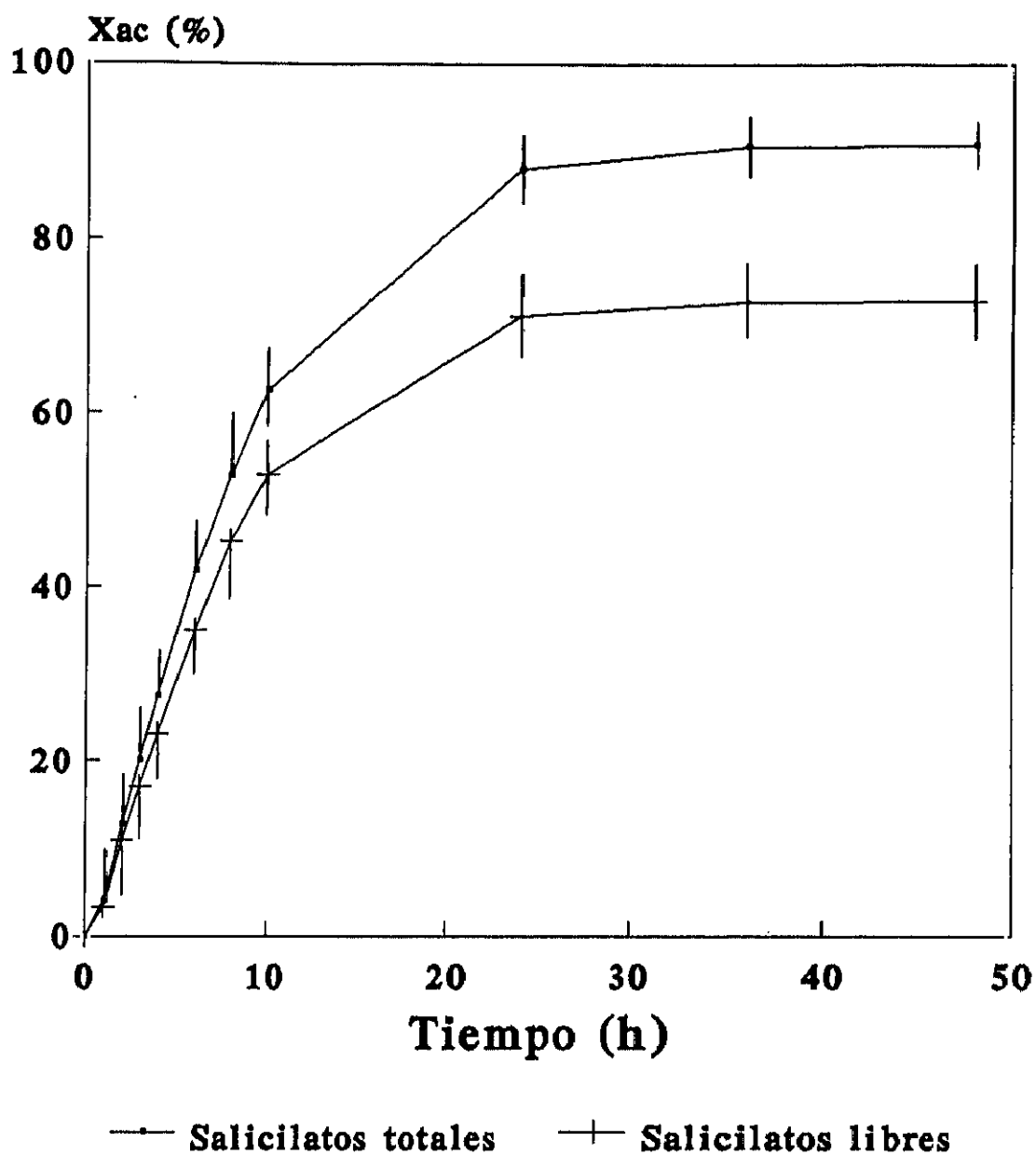


Figura 34. Excreción acumulada de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación B en seis voluntarios.

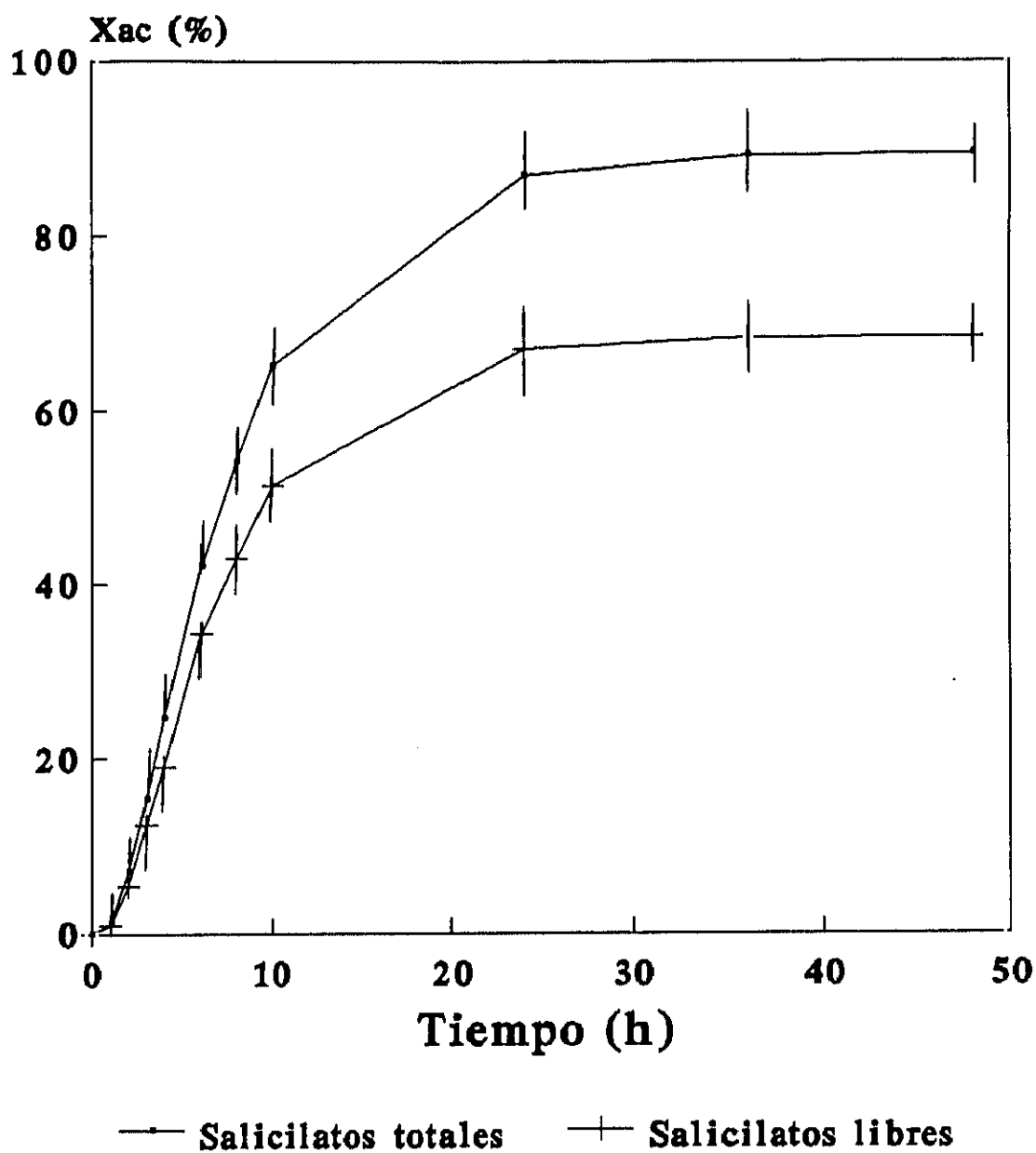


Figura 35. Excreción acumulada de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación C en seis voluntarios.

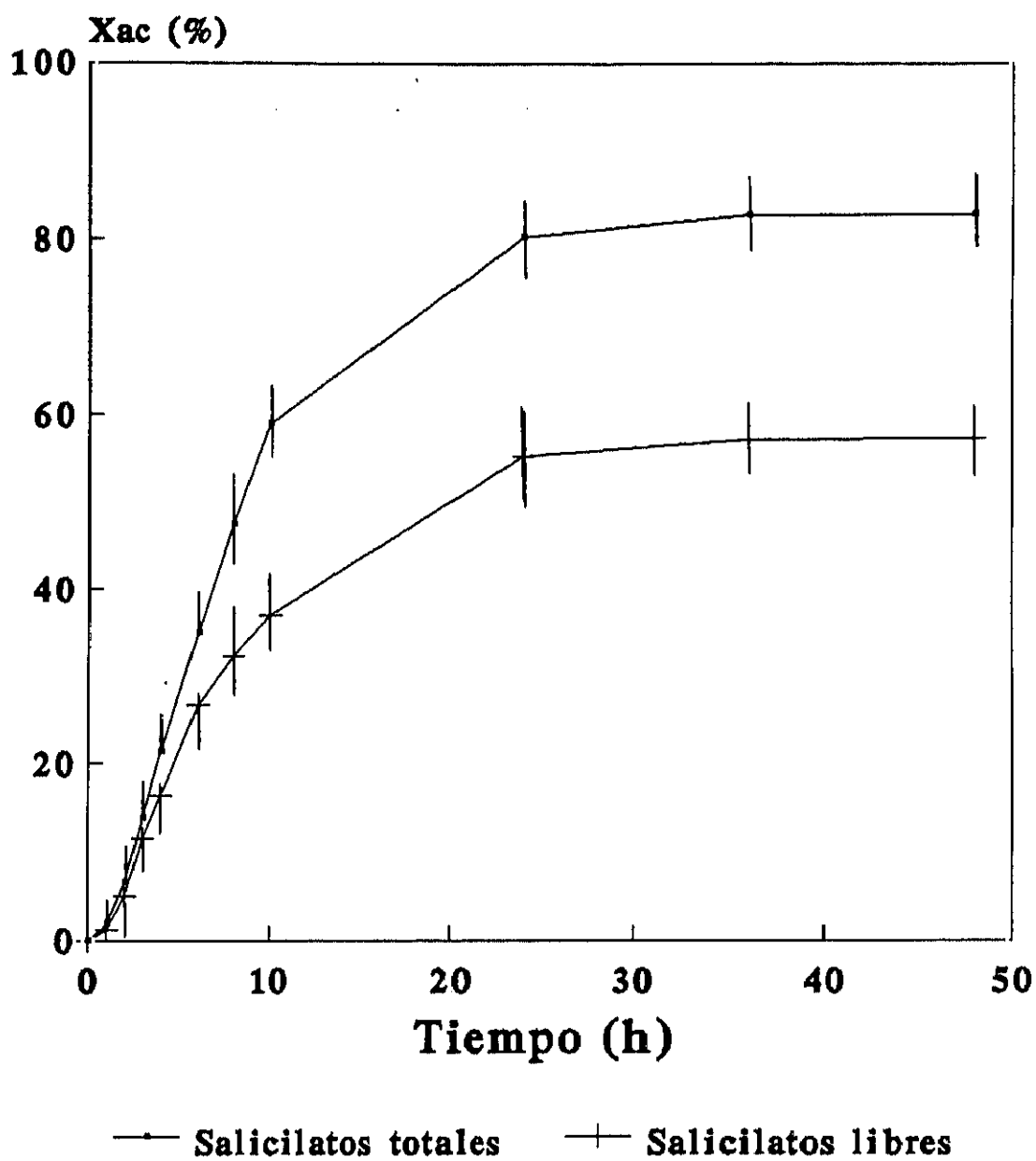


Figura 36. Excreción acumulada de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación D en seis voluntarios.

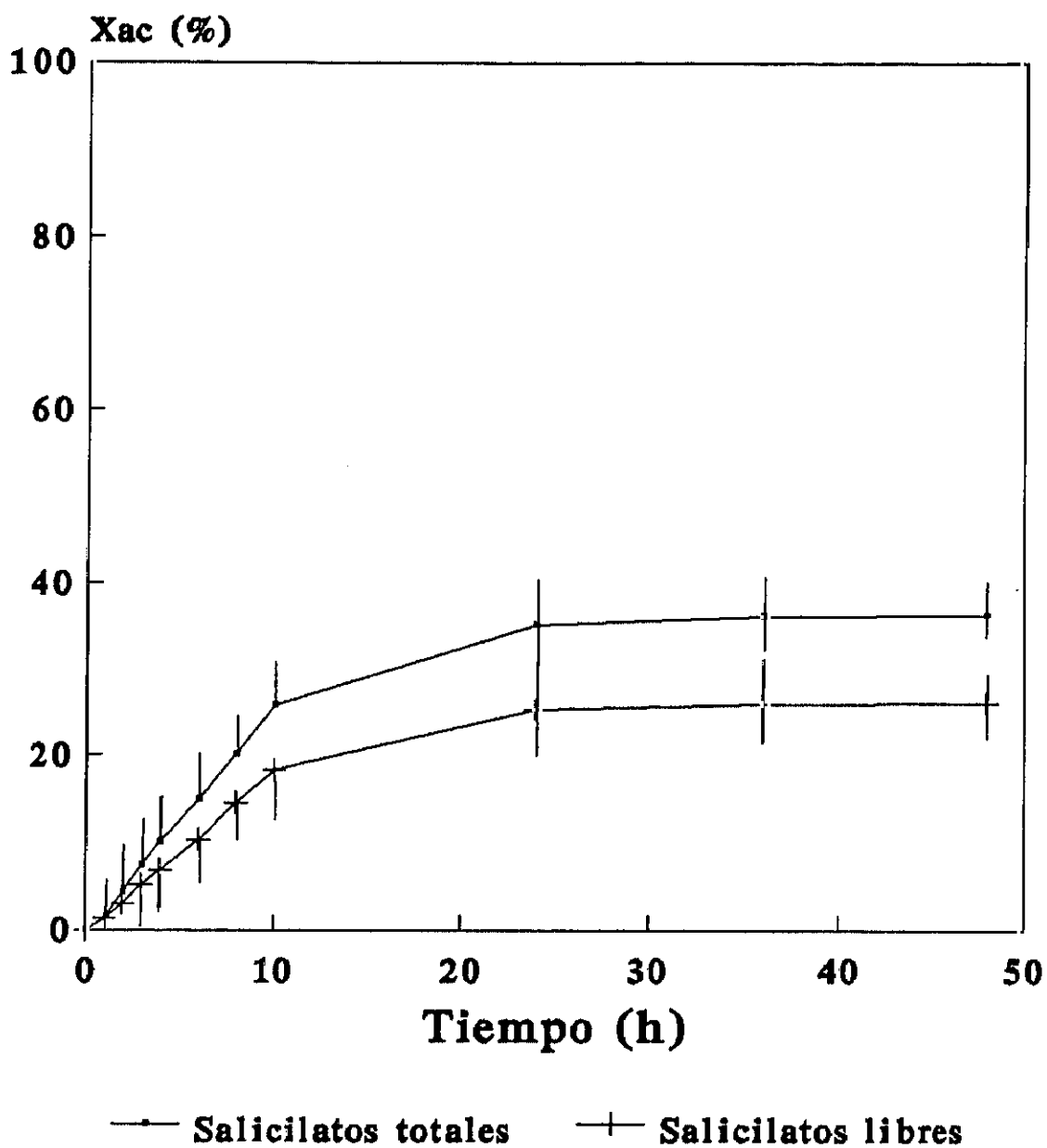


Figura 37. Excreción acumulada de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación E en seis voluntarios.

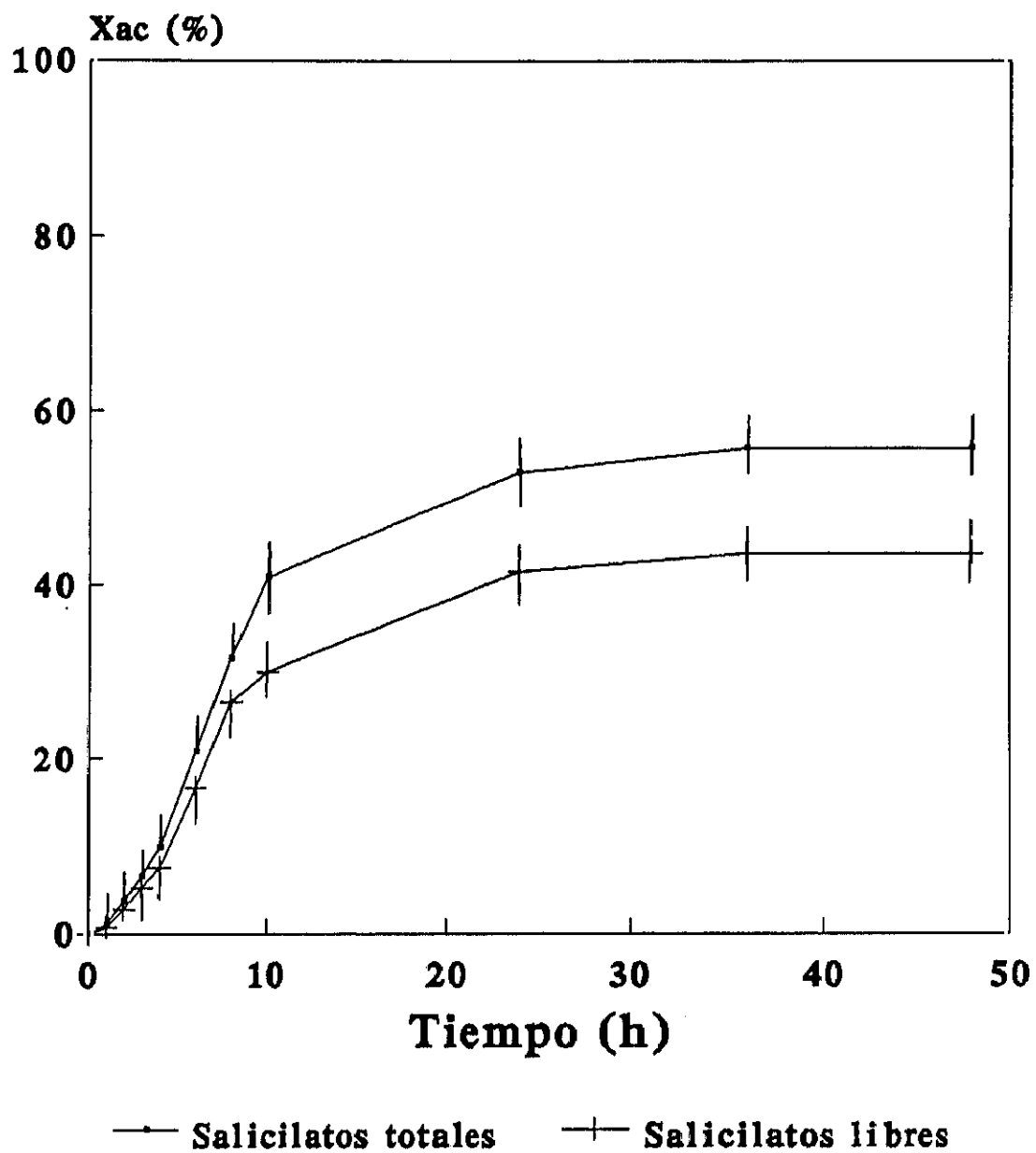


Figura 38. Excreción acumulada de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación F en seis voluntarios.

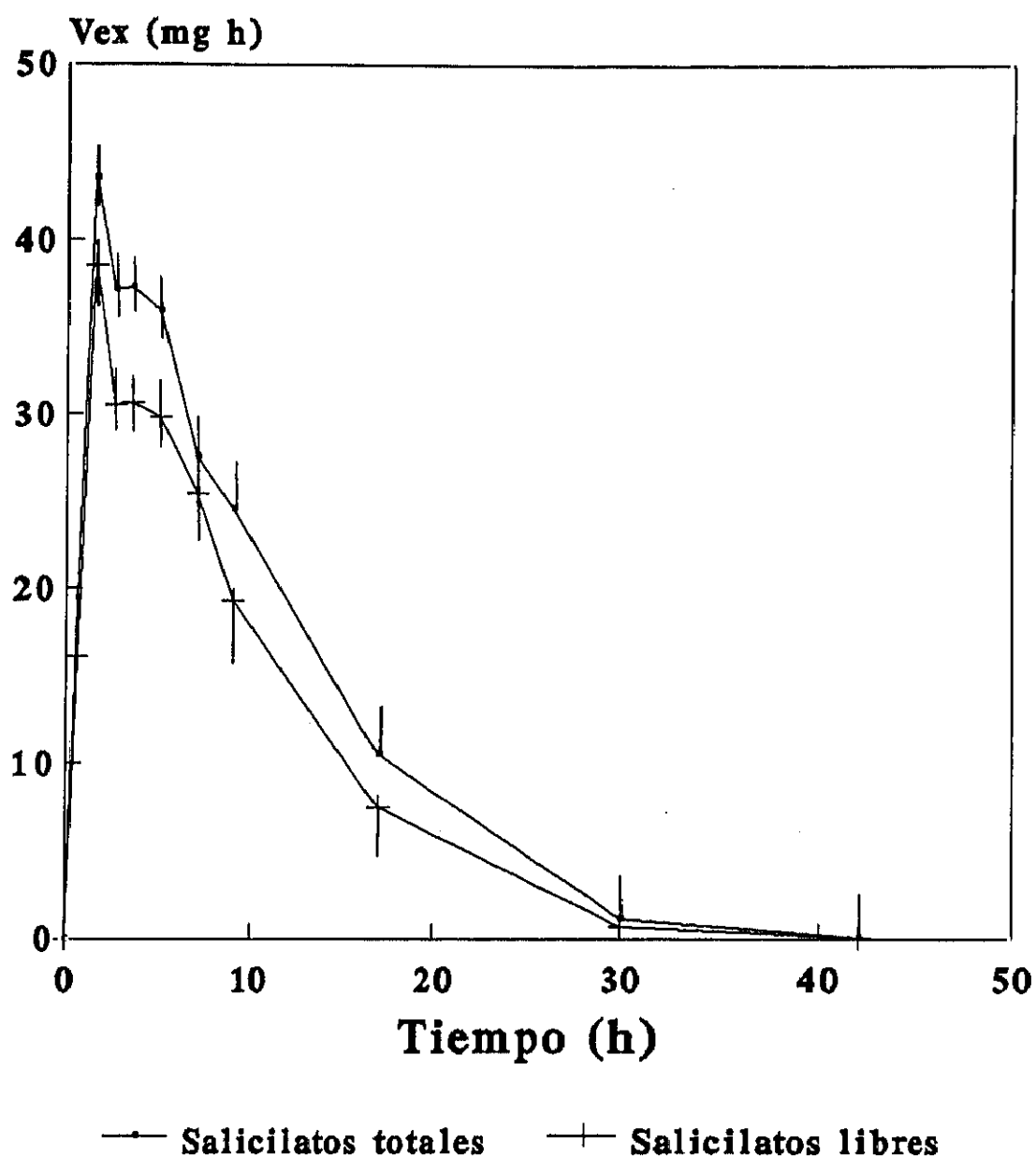


Figura 39. Velocidad de excreción de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación B en seis voluntarios.

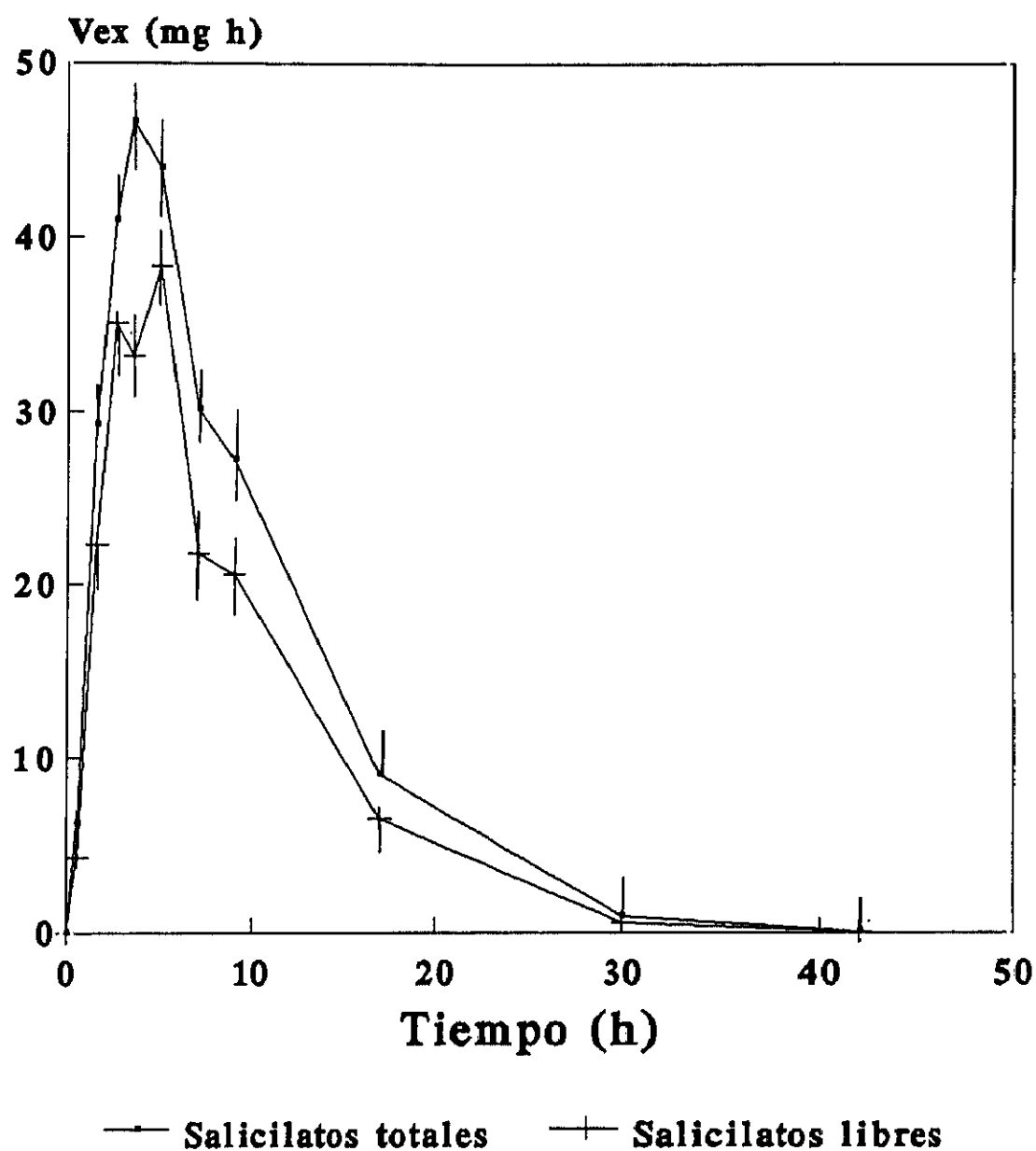


Figura 40. Velocidad de excreción de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación C en seis voluntarios.

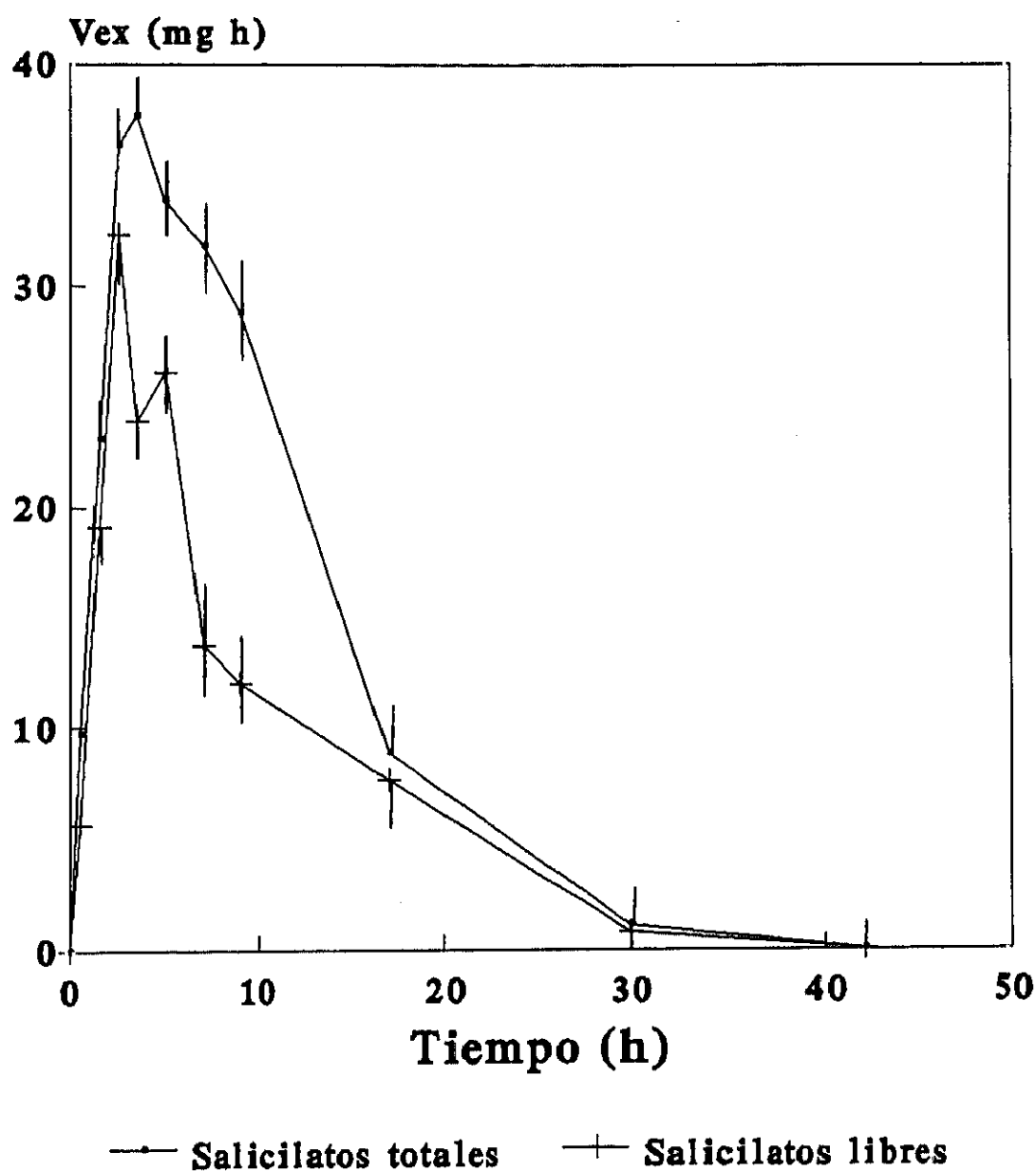


Figura 41. Velocidad de excreción de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación D en seis voluntarios.

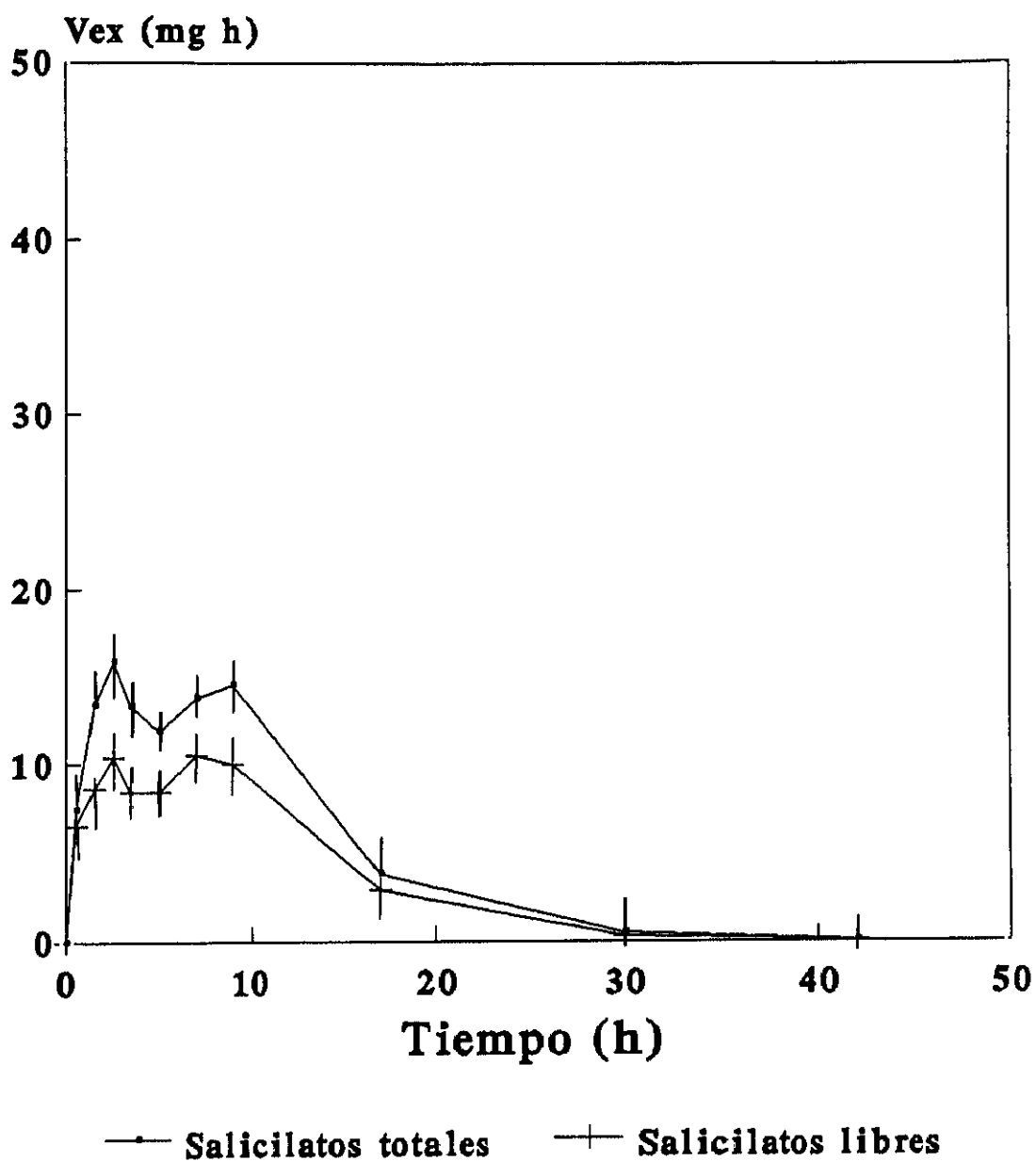


Figura 42. Velocidad de excreción de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación E en seis voluntarios.

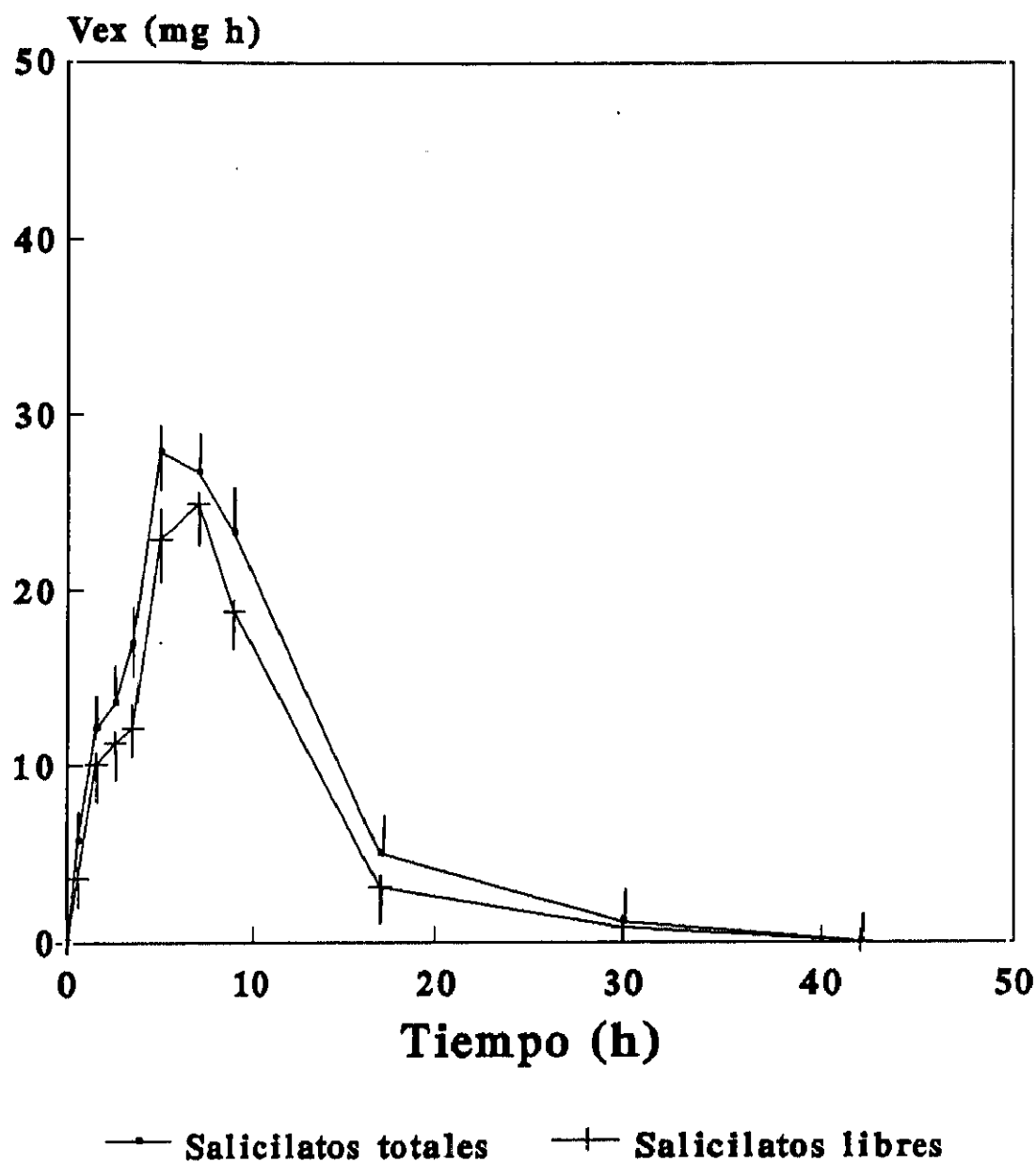


Figura 43. Velocidad de excreción de salicilatos totales y libres después de la administración de la formulación F en seis voluntarios.

Los valores medios de excreción acumulada de salicilatos totales y libres de las seis formulaciones estudiadas se muestran en las figuras 44 y 45.

Los valores medios de velocidad de excreción de las seis formulaciones estudiadas a distintos tiempos se muestran en las figuras 46 y 47.

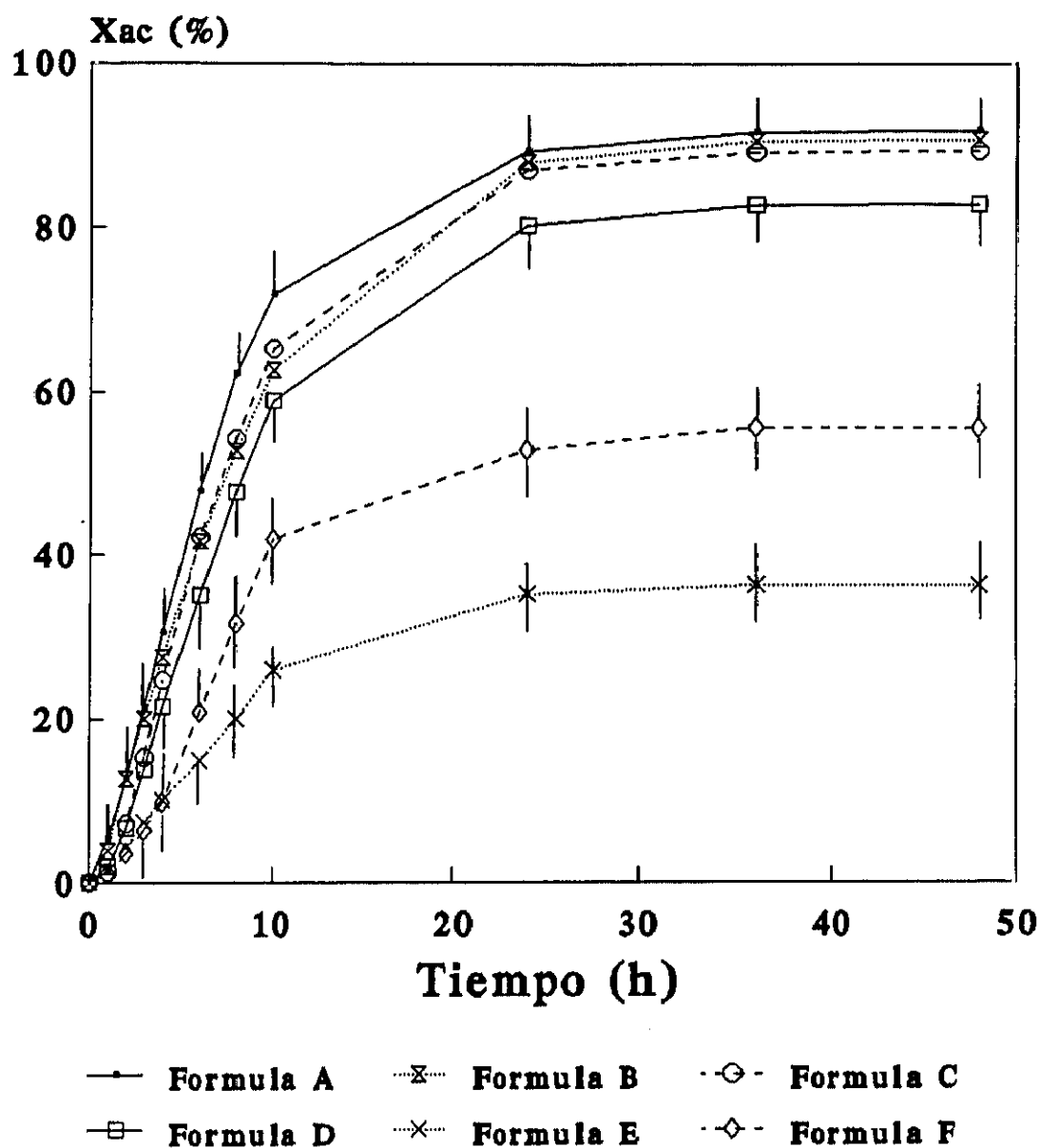


Figura 44. Valores medios de salicilatos totales excretados en forma acumulada para las seis formulaciones estudiadas. Clave:

- Formulaci3n A
- Formulaci3n B
- Formulaci3n C
- Formulaci3n D
- Formulaci3n E
- Formulaci3n F

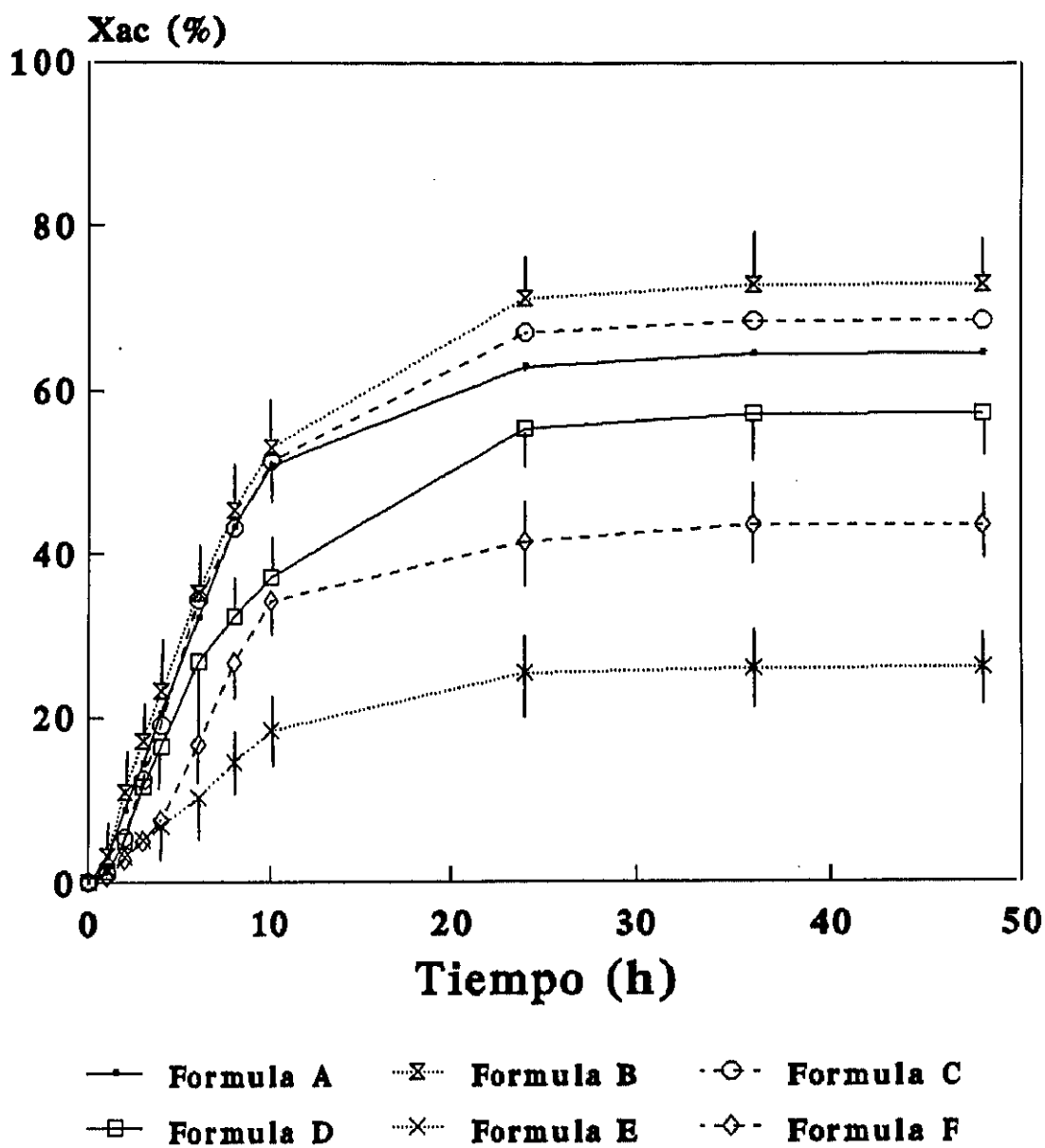


Figura 45. Valores medios de salicilatos libres excretados en forma acumulada para las seis formulaciones estudiadas. Clave:

- Formulación A
- Formulación B
- Formulación C
- Formulación D
- Formulación E
- Formulación F

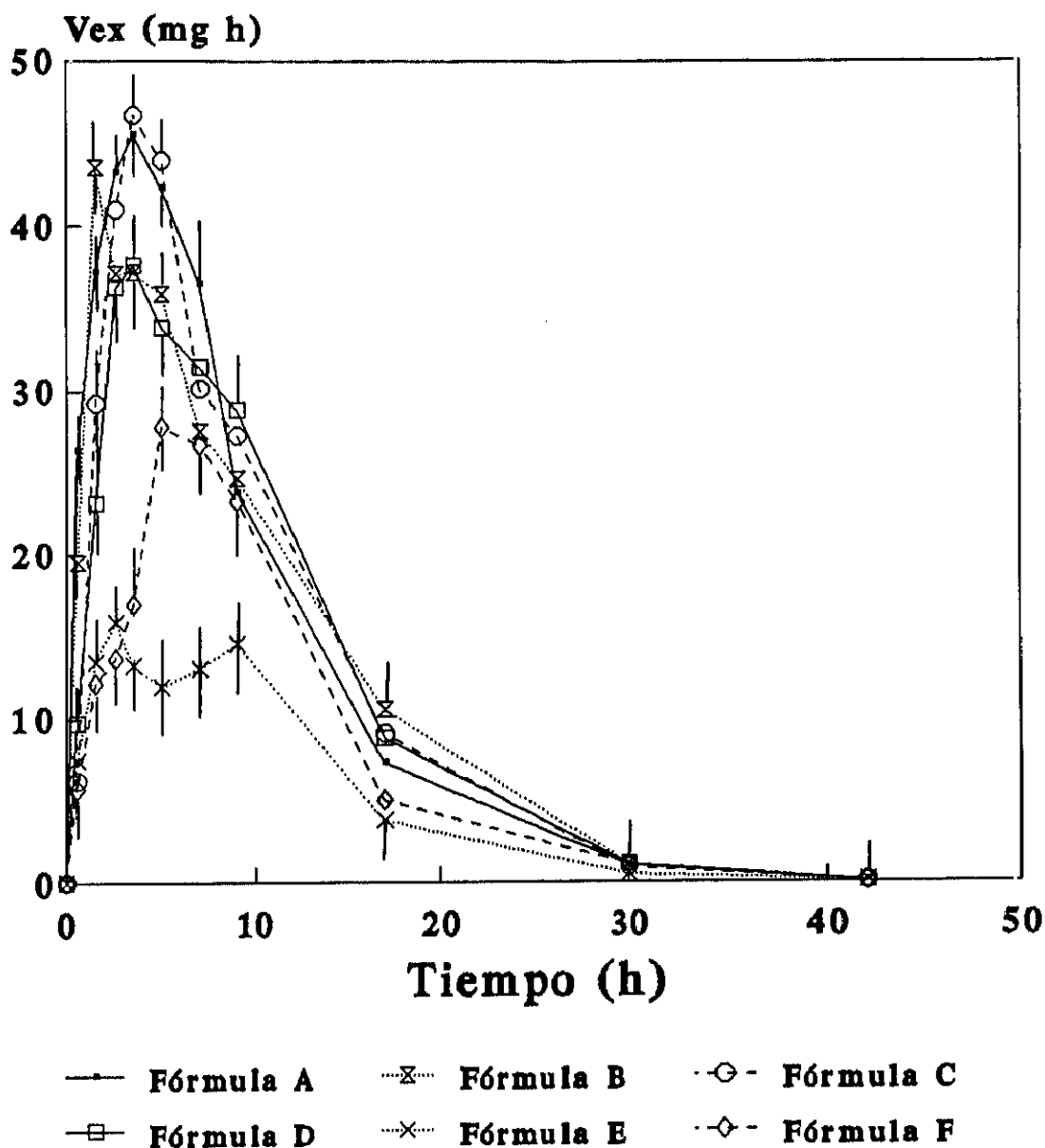


Figura 46. Valores medios de velocidad de excreci6n de salicilatos totales excretados en forma acumulada para las seis formulaciones estudiadas.
 Clave:

- Formulaci6n A
- Formulaci6n B
- Formulaci6n C
- Formulaci6n D
- Formulaci6n E
- Formulaci6n F

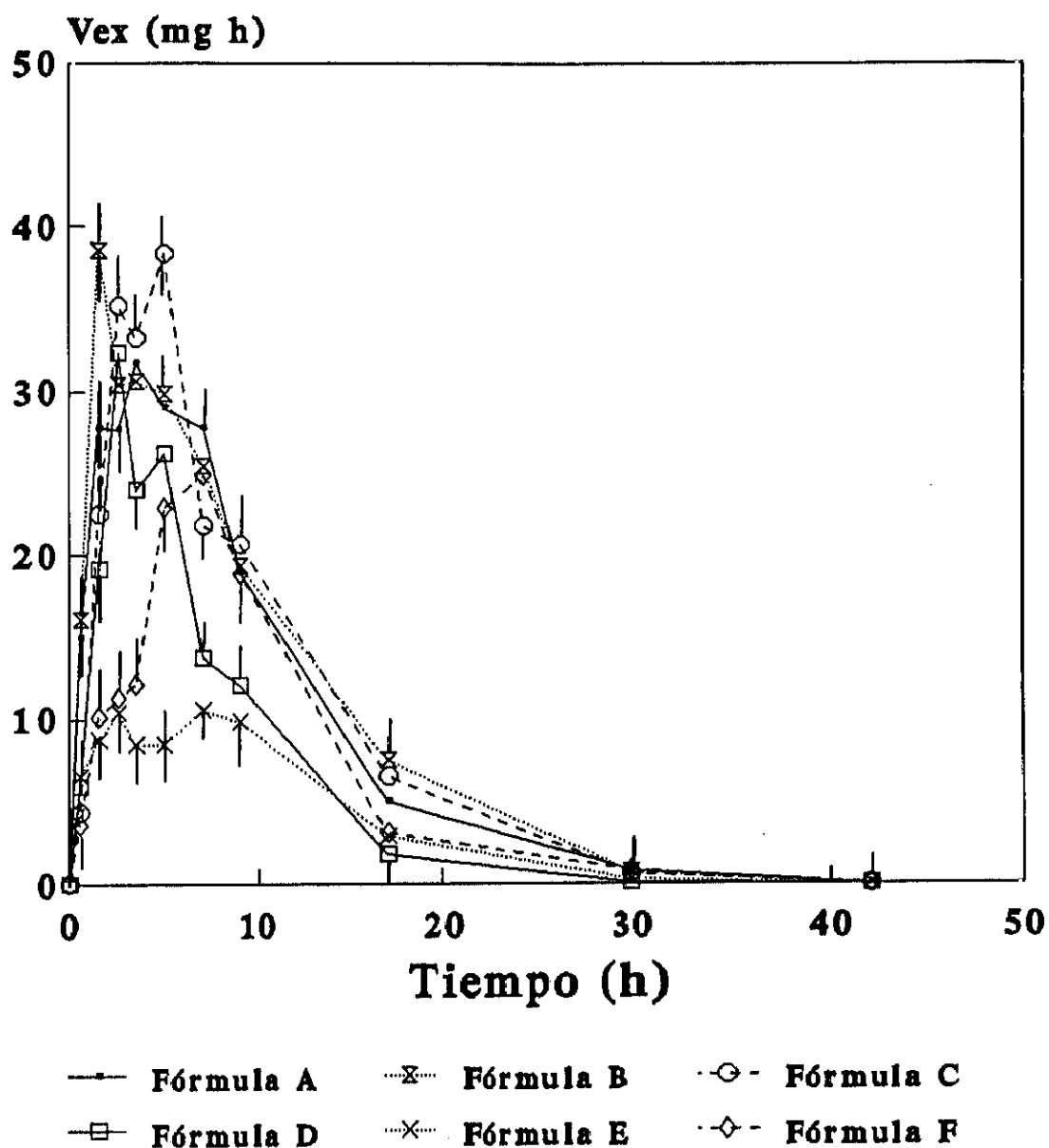


Figura 47. Valores medios de velocidad de excreción de salicilatos totales excretados en forma acumulada para las seis formulaciones estudiadas.
Clave:

- Formulación A
- Formulación B
- Formulación C
- Formulación D
- Formulación E
- Formulación F

En el caso de la excreción de salicilatos libres, el método de Trinder tiene un gran defecto y es que no es capaz de analizar los conjugados glucurónidos y sólo parte del ácido salicílico. por ello y siguiendo las indicaciones de Thiessen (1982), hemos considerado como dato más fiable el obtenido por la determinación de salicilatos totales (Trinder) y es el que utilizamos para el estudio estadístico en la comparación de distintas formulaciones.

En la siguiente tabla (tabla 31) se muestran los resultados medios y desviaciones estándar (entre paréntesis) de los ensayos de biodisponibilidad relativa realizados en los seis voluntarios para las seis formulaciones estudiadas.

FORMULACION

	A	B	C	D	E	F
AUC ₀	476,2 (10,9)	468,2 (10,8)	475,4 (12,9)	445,9 (14,5)	298,2 (23,4)	308,0 (19,1)
X _{u ac 0}	458,2 (12,2)	452,9 (14,5)	445,8 (16,8)	413,5 (10,6)	181,0 (21,2)	278,1 (15,3)
V _{ex max}	48,3 (4,2)	44,6 (2,4)	48,7 (2,6)	39,1 (0,9)	17,3 (1,2)	29,3 (1,2)
t _{max}	3,5 (1,2)	2,0 (0,8)	4,0 (0,8)	3,9 (1,2)	7,2 (2,5)	5,7 (1,1)
K _e	0,21 (0,03)	0,23 (0,02)	0,22 (0,02)	0,21 (0,03)	0,18 (0,01)	0,19 (0,04)
BR (AUC)	100,0 (2,3)	98,3 (1,9)	99,8 (2,2)	93,6 (2,5)	41,6 (4,7)	64,7 (3,8)
BR (X _{u ac})	100,0 (2,8)	98,8 (3,0)	97,3 (3,1)	90,2 (2,2)	39,5 (4,3)	60,7 (2,9)

Tabla 31. Resultados medios y desviación estandard (entre paréntesis) de los ensayos de biodisponibilidad relativa realizados para las seis formulaciones.

En la tabla 32 se muestra el nivel de significación en un estudio comparado de media múltiples mediante un análisis de varianza.

Cuando se estudió una posible relación entre los parámetros de excreción (X_{ac} , $V_{ex\ max}$ y t_{max}) y los distintos voluntarios que participaron en el ensayo mediante un análisis de varianza (ANOVA), no se encontraron diferencias significativas, que sí se encontraron cuando se relacionaron parámetros con formulaciones (resultados en tabla 32).

De los resultados de cantidad excretada, velocidad de excreción y tiempo a que aparece el máximo de velocidad de excreción (tabla 32), se puede apreciar cómo las tres primeras formulaciones (A, B y C) tienen un comportamiento muy parecido, mientras que las formulaciones D, E y F son más diferentes, especialmente las dos últimas (E y F). Este hecho parece estar relacionado con los valores de velocidad de disolución "in vitro" (ver figura 31); cuanto más lenta es la disolución "in vitro", menor es el valor máximo de velocidad de excreción y mayor es el tiempo en que aparece ese máximo. Así mismo, al disminuir la velocidad de disolución "in vitro" disminuyen los valores de área bajo la curva, cantidad total eliminada y la biodisponibilidad relativa.

FORMULAS COMPARADAS	NIVEL DE SIGNIFICACION		
	X_{uac}	$V_{ex\ max}$	t_{max}
A-B	N.S.	N.S.	N.S.
A-C	N.S.	N.S.	N.S.
A-D	S (P<0,05)	S (P<0,01)	N.S.
A-E	S (P<0,01)	S (P<0,01)	S (P<0,01)
A-F	S (P<0,01)	S (P<0,01)	S (P<0,01)
B-C	N.S.	N.S.	N.S.
B-D	N.S. (casi)	S (P<0,05)	N.S.
B-E	S (P<0,01)	S (P<0,01)	S (P<0,01)
B-F	S (P<0,01)	S (P<0,01)	S (P<0,01)
C-D	N.S.	S (P<0,01)	N.S.
C-E	S (P<0,01)	S (P<0,01)	S (P<0,05)
C-F	S (P<0,01)	S (P<0,01)	N.S.
D-E	S (P<0,01)	S (P<0,01)	S (P<0,05)
D-F	S (P<0,01)	S (P<0,01)	N.S.
E-F	S (P<0,01)	S (P<0,01)	N.S.

Tabla 32. Nivel de significación en un estudio comparado de medias múltiples mediante un análisis de varianza (ANOVA). Entre paréntesis la probabilidad de error.

Clave: S - diferencia significativa

N.S. - diferencia no significativa (P<0,05).

DISCUSION FINAL

DISCUSION FINAL.

A continuación vamos a comentar algunas de las características más importantes de los métodos analíticos utilizados.

Mediante HPLC (método oficial de la USP XXII) es posible separar y evaluar cuantitativamente AAS y AS. Es por ello el método más completo de los estudiados. Su principal inconveniente es el tiempo de duración de análisis.

La espectrofotometría directa en el punto isosbético, es una técnica válida para la cuantificación de AAS en los ensayos de velocidad de disolución (USP XXII), tiene como principal ventaja su sencillez y rapidez de análisis, y como inconveniente la interferencia del AS.

La espectrofotometría de segunda derivada es también un método rápido, con el que se pueden analizar de forma cuantitativa tanto el AAS, como el AS, en una misma muestra. Debido a ser un método relativamente moderno (Mazzeo y col, 1982) (Kitamura y col, 1983) se validó con respecto a la técnica de HPLC.

La técnica colorimétrica de Trinder (1954) es un método clásico para análisis de salicilatos libres y totales. Debido a su rapidez y sencillez se utilizó para la valoración de las muestras biológicas. Su principal inconveniente es su baja sensibilidad y el error analítico en muestras con bajas concentraciones de salicilatos (Thiessen, 1982).

El método espectrofluorimétrico es otro método sencillo, con una gran sensibilidad. Tiene como inconvenientes el que sólo detecta AS y su error analítico es relativamente alto.

La cromatografía en capa fina, ha sido utilizada como método cualitativo y aunque es un buen método separativo y tiene una buena sensibilidad, tiene como inconveniente el tiempo de duración del análisis que es el más largo de los métodos utilizados. En ocasiones se puede cuantificar por densidometría (Tomankova y Vasatova, 1989).

Una vez puestas a punto las técnicas analíticas se procedió a la elaboración de distintas formulaciones (en total más de 40).

Según la velocidad de disolución "in vitro" se pueden clasificar en formulaciones convencionales (o de cesión rápida) y de cesión sostenida. Las aplicaciones farmacológicas serían como analgésicas (las de cesión rápida) y antirreumáticas y antitrombóticas (las de cesión sostenida).

La velocidad de disolución se vió aumentada mediante el empleo de formulaciones con un granulado realizado a partir de AAS micronizado. Así pues, y como era lógico, al utilizar partículas de menor tamaño (aunque esté granulado) la velocidad de disolución se hace más rápida. Este resultado concuerda con el de Lastres y col (1981).

Cuando se estudió la posible aplicación de dispersiones sólidas de manitol y PVP, se observó que en el caso del

manitol se podían conseguir velocidades de cesión más rápidas.

Cuando se utilizó Eudragit E como aglutinante y se formaron pelets, aún con almidón (al 10% p/p) en su composición, la velocidad de cesión era más lenta que los cristales de AAS de referencia.

Se utilizaron distintos tipos de Eudragit para la formación de cubiertas de pelets. Con el Eudragit L se consiguió una cubierta entérica. Los pelets recubiertos con Eudragit RL no retrasaban prácticamente la velocidad de cesión. Por lo que se utilizó un derivado más impermeable (Eudragit RS) para formas de cesión sostenida. Con este fin se probaron distintas proporciones de Eudragit. Al aumentar el porcentaje de polímero se retrasa la velocidad de disolución. En nuestras condiciones de trabajo, el valor máximo de Eudragit que se pudo incorporar a la cubierta sin que aparecieran excesivos problemas de aglomeración, fué de un 20% p/p.

Cuando se estudiaron las características de compresibilidad de los pelets recubiertos se comprobó que estos tenían buena compresibilidad y que se podía mejorar con la incorporación de Avicel PH 102, como ya se ha descrito por otros autores (Saleh y Stamm, 1988).

La velocidad de cesión en comprimidos obtenidos a partir de pelets está en función del porcentaje de AAS recubierto en las distintas formulaciones, el tipo de cubierta utilizada y los exci-pientes empleados (Capan y col, 1989) (Melzig, 1990).

Cuando se utilizó Avicel y almidón de trigo se observó que aumentaba considerablemente la velocidad de disolución, debido a un efecto disgregante. Cuando se utilizó Celutab también se consiguió aumentar su velocidad de cesión, aunque siempre fué una cesión más lenta que la resultante de los obtenidos con Avicel o almidón.

Al estudiarse la estabilidad ambiental del AAS con distintos tipos de Eudragit se observó que los mejores resultados se obtenían con Eudragit RS, posiblemente debido a su poca permeabilidad al agua. Por el contrario, los Eudragit E y L, así como las dispersiones sólidas tenían malas características de estabilidad. Esto se debe al carácter catiónico del Eudragit E, al carácter aniónico del L y a su elevada capacidad de captación de la humedad. Esta capacidad de captación de la humedad se ve muy aumentada en las dispersiones sólidas. Por ello se descartan este tipo de formulaciones para posteriores estudios. Es necesario tener en consideración que la velocidad de cesión de formulaciones de AAS conteniendo Eudragit, pueden modificarse con el tiempo (Al-Gohary y col, 1989).

La polivinilpirrolidona presenta problemas de estabilidad debido a dos de sus características, su higroscopicidad ya citada por Callaham y col (1982) y confirmada por nosotros en la DS2 (ver figura 22), y por otro lado su naturaleza catiónica, que favorece la hidrólisis, lo que concuerda con los datos reflejados en la tabla 27 para esta misma formulación DS2.

El orden de mayor a menor estabilidad para un 3% AS es:

C10 > P10 > P4 > C24 > DS2

Siendo la formulación DS2 la peor de todas por el efecto de la PVP en la hidrólisis del AAS.

La gastrotoxicidad de las formulaciones estudiadas se correlaciona con los ensayos de velocidad de disolución. Al aumentar la velocidad de disolución se produce una tendencia a disminuir la irritación gástrica. El granulado G1, logra un efecto gastroprotector según el método de Rainsford (1982), llegando a no presentar una diferencia significativa ($p < 0,05$), frente a un gastroprotector como el α -bisabolol.

El uso de α -bisabolol, un aceite esencial extraído de la camomilla, tiene unas características protectoras de la irritabilidad gástrica producida por las formulaciones de AAS, por lo que podría ser interesante la realización de estudios posteriores para comprobar esta posible actividad y su posible inclusión en formulaciones de AAS.

En los estudios de biodisponibilidad relativa se comparan distintos tipos de formulaciones, a las que llamaremos A, B, C, D, E y F.

La formulación A, es una formulación de tipo convencional con una mezcla de AAS con Avicel PH 102, con un buen perfil de velocidad de excreción urinaria. Sus parámetros de biodisponibilidad relativa ($X_{u,ss}$, $V_{ex, max}$ y t_{max}) se toman como patrón para un análisis de varianza (ANOVA) (ver tabla 32).

La fórmula C, corresponde a una especialidad farmacéutica comercializada, constituida por pelets de AAS con etilcelulosa y que se presenta en forma de comprimidos de disgregación rápida. Su bajo retraso en los estudios de disolución no permite observar diferencias significativas ($p < 0,05$) en los parámetros de biodisponibilidad relativa ($X_{u \infty}$, $V_{ex \max}$ y t_{max}) frente a la formulación A tomada como referencia.

Las formulaciones B y E presentan un 75% del total del AAS recubierto, diferenciándose en que la fórmula B presenta un 25% de Avicel PH 102, lo que facilita su disgregación, permitiendo comparar un comprimido matricial (fórmula E) frente a un comprimido que al disgregarse libera el AAS y los pelets P10 (fórmula B). Su diferencia en la biodisponibilidad relativa es muy acusada; así la fórmula B presenta un comportamiento de un comprimido convencional, mientras que la fórmula E presenta un comportamiento de comprimido matricial con una diferencia significativa en biodisponibilidad relativa ($p < 0,01$) frente a las formulaciones A, B y C.

La fórmula D, presenta todo su AAS en forma recubierta (P10) y con una elevada proporción de Avicel PH 102 (25% p/p), que produce la disgregación del comprimido y la liberación de los pelets de AAS (P10). En algunos parámetros de biodisponibilidad relativa aparecen diferencias significativas ($X_{u \infty}$, $p < 0,05$ y $V_{ex \max}$, $p < 0,01$).

La fórmula F, es una especialidad farmacéutica comercializada en forma de cápsulas que contienen pelets con un recubrimiento entérico y que consideraremos como patrón,

apareciendo diferencias significativas ($p < 0,01$) mediante un análisis de varianza (ANOVA) respecto a las restantes formulaciones en valores de $X_{u\infty}$ y $V_{ex\max}$.

Al estudiar las características de biodisponibilidad relativa de las distintas formulaciones de AAS se observó que al retrasar la velocidad de disolución "in vitro", se disminuye el valor máximo de velocidad de excreción, disminuye el tiempo a que aparece el máximo de velocidad de excreción urinaria (t_{\max}) y se disminuye también la cantidad total excretada ($X_{u\infty}$). Todo ello da lugar a una disminución de la biodisponibilidad relativa. Esto se puede observar en las figuras 48, 49 y 50.

Como se puede ver en las gráficas, existe una correlación entre los resultados de velocidad de disolución in vitro, representados por el TD50 y el valor máximo de velocidad de excreción, el tiempo en que aparece ese máximo y los valores de cantidad total acumulada.

Quizá el hecho más interesante es que al disminuir la velocidad de disolución se disminuye la biodisponibilidad relativa y aunque haría falta realizar estudios en un número mayor de voluntarios, esto parece indicar que existe una zona de máxima absorción de AAS, pasada la cual se hace mucho más difícil su absorción.

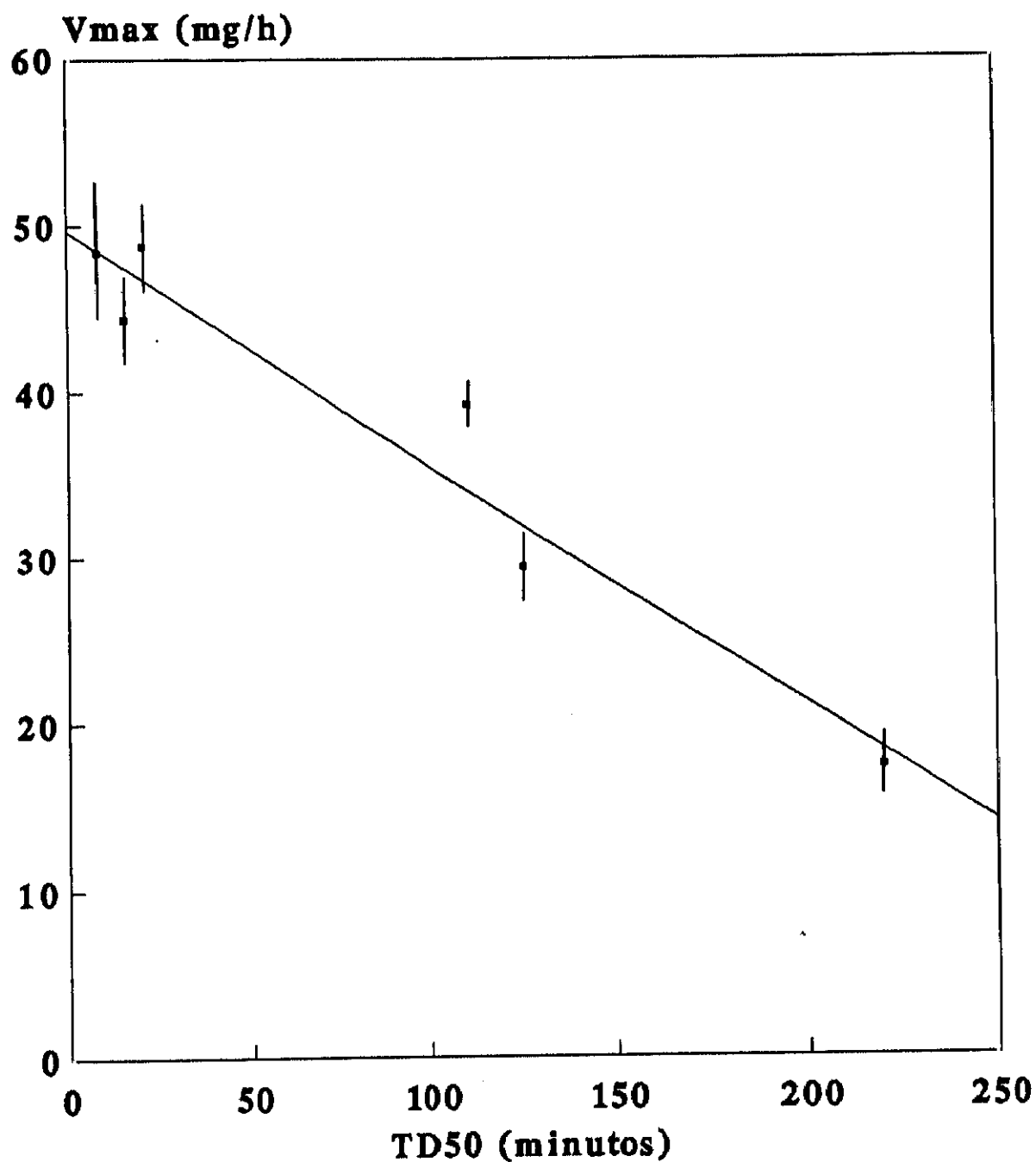


Figura 48. Correlación existente entre el tiempo de disolución "in vitro" (representado como TD50) y el valor máximo de velocidad de excreción urinaria in vivo.

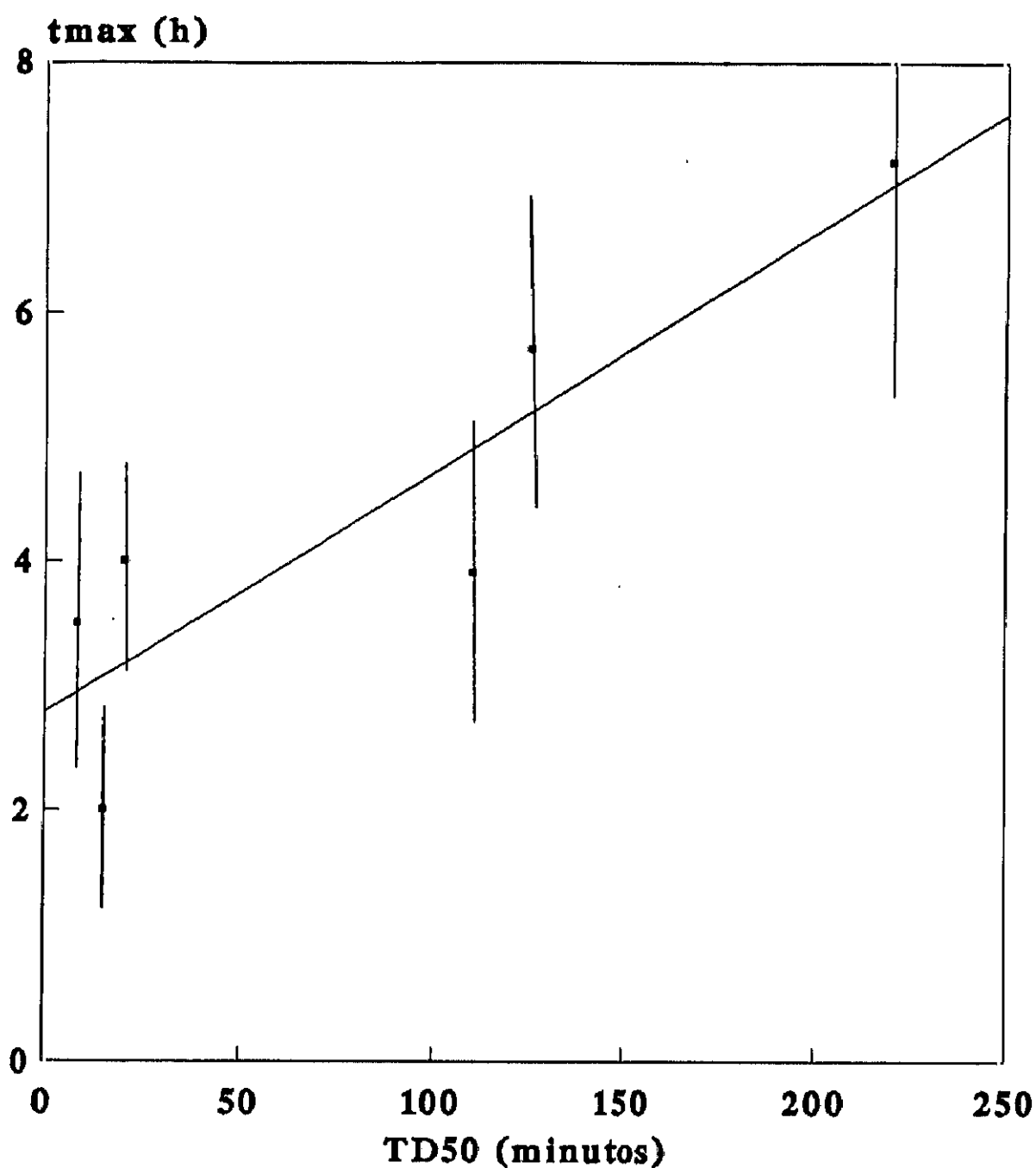


Figura 49. Correlación existente entre el tiempo de disolución "in vitro" (representado como TD50) y el tiempo a que aparece el máximo de velocidad de excreción urinaria "in vivo".

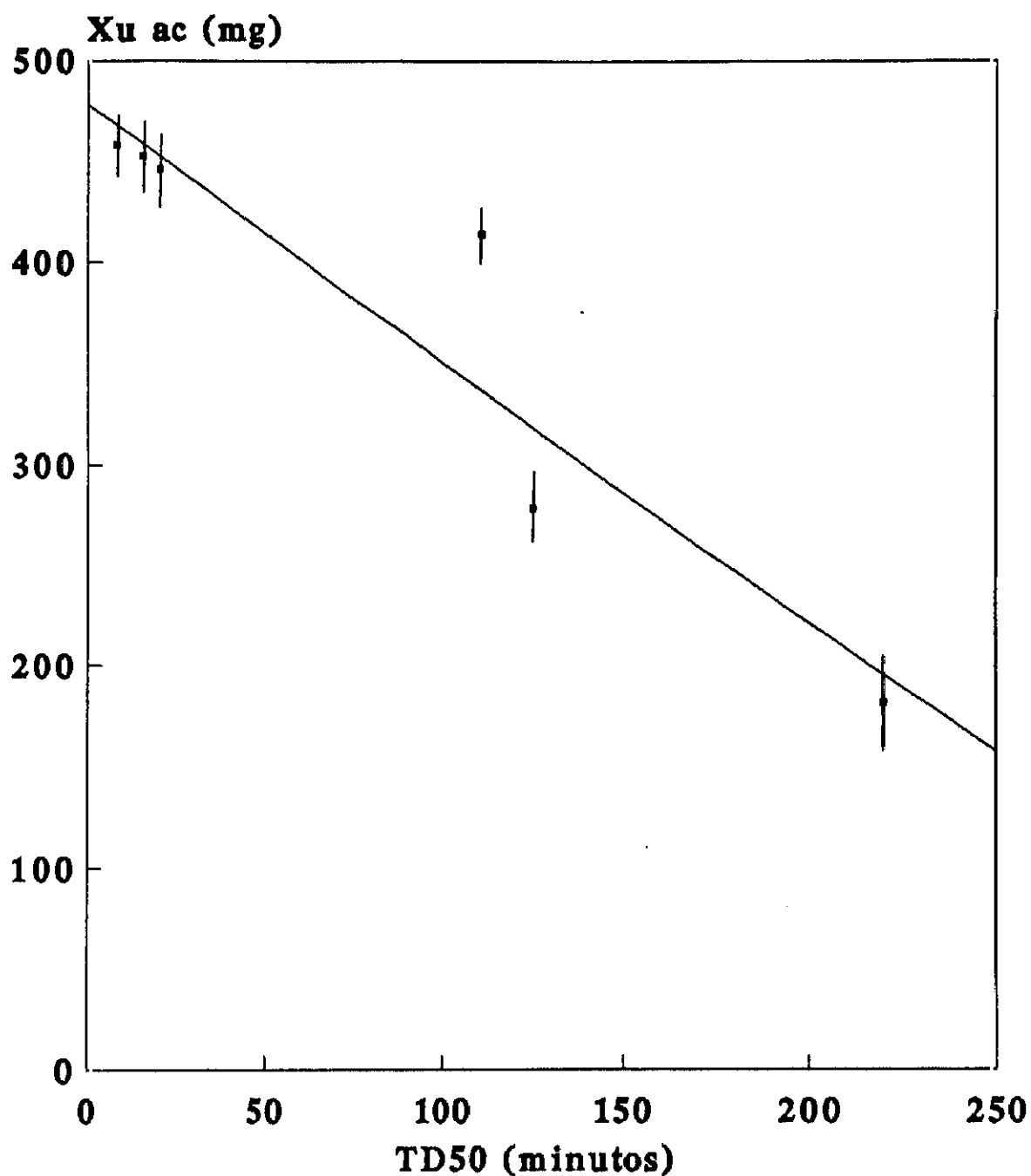


Figura 50. Correlación existente entre el tiempo de disolución "in vitro" (representado como TD50) y la cantidad acumulada de salicilatos totales excretados en orina en el estudio "in vivo".

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

1°. Según el tipo de muestra a analizar se selecciona el método analítico que reúna mejores condiciones. En nuestro caso se pusieron a punto y se utilizaron métodos de espectrofotometría directa, espectrofotometría de segunda derivada, colorimetría, HPLC, espectrofluorimetría y cromatografía en capa fina.

2°. La velocidad de disolución varía según se utilicen gránulos, cristales, pelets, dispersiones sólidas o comprimidos. Según los excipientes utilizados se pueden obtener distintos tipos de velocidad de disolución, que se pueden ajustar para obtener formulaciones analgésicas (cesión rápida), o antirreumáticas y antitrombóticas (cesión sostenida).

3°. Los pelets recubiertos con Eudragit RS tienen buenas características de compresibilidad. Estas características pueden ser útiles para predecir la velocidad de disolución de los comprimidos obtenidos.

4°. El Eudragit RS, por su carácter neutro y poco permeable a la humedad, tiene mejores características de estabilidad que el Eudragit E y L. Las dispersiones sólidas estudiadas tienen una gran hidroscopticidad por lo que su estabilidad es muy baja.

5°. La gastrototoxicidad depende de la velocidad de disolución. A mayor velocidad de disolución, menor irritabilidad gástrica.

6°. El α -bisabolol, producto obtenido por extracción de la camomilla, tiene un efecto protector de la irritabilidad gástrica causada por el AAS.

7°. Al retrasar la velocidad de disolución "in vitro", disminuye el valor máximo de velocidad de excreción y la cantidad total excretada.

8°. En las formulaciones estudiadas, al disminuir la velocidad de cesión "in vitro" disminuye también su biodisponibilidad relativa.

9°. Por orden creciente de biodisponibilidad, las formulaciones estudiadas presentan el siguiente comportamiento:

$$A > B > C > D > F > E$$

BIBLIOGRAFIA

Referencias.

- Aarons L., Hopkins K., Rowland M., Brossel S. y Thiercelin J.F., Pharm. Research, 6, 660 (1989).
- A.E.F.I. Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad. "Validación de métodos analíticos". Castro C.M., Gascón F.S., Pujol F.M., Sans R.J.M. y Pla LL.V. Hewlett Packard (eds.), Barcelona (1989).
- Al-Gohary O.M., Al-Gamal S.S., Hammad A. y Molokhia A.M., Int. J. Pharm., 55, (1), 47 (1989).
- Aly S.A.S. y Udeala O.K., S.T.P. Pharma, 3, (1), 23 (1987).
- Azanza J.R. y Cuenca R., "Intoxicación e interacciones farmacológicas producidas por el ácido acetilsalicílico". Vila Sala Hermanos S.A. Barcelona (1986).
- Baird W.M. y Turek D. J., Clin. Pharmacol., 20, 243 (1980).
- Barnett H.J.M., En "Acetylsalicylic acid: New uses for an old drug". Barnett H.J.M, Hisch J. y Mustard J.F. (eds). Raven Press. New York. p. 175 (1982).
- Bauer R.F., Digestive Diseases and Sciences, 30, (11), 118S (1985).
- Bauer R.F., Bianchi R.G., Casler J. y Goldstin B., Digestive Disease and Science, 31, 2, 81S (1986).

- Beaver W.T., Arch. Intern. Med., 141, 293 (1981).
- Belsare S.D., Indian J. Exp. Biol., 19, 88 (1981).
- Bell S.A. y col., J. New Drugs, 6, 284 (1966).
- Benerjee R.K., Biochim. Biophys. Acta, 1034, (3), 275 (1990).
- Benigni A. y col., N. Eng. J. Med., 321, 357 (1989).
- Berkow R., The Merk manual of diagnosis and therapy. Rahway. Merck Sharp Dohme, New Jersey (1977).
- Blendinger I. y Eberlein H.J., Br. J. Clin. Pharmacol., 10, 339S (1980).
- Bloomfield S.S., Barden T.P. y Mitchell J., Clin. Pharmacol. Ther., 21, 414s (1977).
- Bloomfield S.S., Barden T.P., Mitchell J. y Bichlmeir G., Current Ther. Res., 30, 670 (1981).
- Boggiano B.G., Drew R. y Hancock R.D., Aust. J. Pharm., 51, S14 (1970).
- Borella L.E., DiJoseph J.F. y Mir G.N., Arzneim.-Forsch., 39, (7), 786 (1989).
- Bower R.J., Umbenhauer E.R. y Hereus V., "Advances in inflammation research" en Weissmann G., Samuelsson B. y Paoletti R. (eds). Vol. 1. Raven Press. New York. p. 559 (1979).

- Brooks P.M., Australian New Zealand J. Med. Suppl., 8, 101 (1978).
- Brooks P.M. y Buchanan W.W., "Recent advances in rheumatology"
ed. Puchanan W.W. y Dick W.C. (eds). Churchill Livingstone. Edinburgo. p.
34 (1976).
- Callahan J.C., Cleary G.W., Elefant M., Kaplan G., Kensler T. y Nash
R.A., Drug Dev. Ind. Pharm., 8, (3), 335 (1982).
- Canada A.T. y Little A.H. Curr. Therap. Res., 18, 727 (1975).
- Capan Y., Senel S. Calis S., Takka S. y Hincal A.A., Pharm. Ind., 51,
(4), 443 (1989).
- Carstensen J.T., J. Pharm. Sci., 63, 1 (1974).
- Cartwright A.C., S.T.P. Pharma, 3, 79 (1987).
- Caruso I., Fumagalli M., Montrone F., Vernazza M., Bianchi Porro G. y
Petrillo M., "Diflunisal in clinical practice". Proceedings of a Conference
at the XIVth International Congress of Rheumatology. San Francisco. Ed.
Futura. N.Y. p. 63 (1978).
- Cavanagh R.L., Buyniski J.P. y Schwartz S.E., J. Pharmacology Exp.
Ther., 243, (3), 1179 (1987).
- Chasovnikova L.V., Formazyuk V.E., Sergienko V.I., Boldyrev A.A. y
severin S.E., Biochem. Int., 20, (6), 1097 (1990).

- Chion W.L y Onyemelukwe I., J. Clin. Pharmacol., 14, 597 (1974).
- Chopra I. y Solomon D.H., VIIIth International thyroid congress. Sydney. Abstract 186 (1980).
- Clark R.L. y Lasagna L. Clin. Pharmacol. Therap., 6, 568 (1965).
- Clarck's Isolation and Identification of Drugs, 2a ed. The Pharm. Press, London (1986).
- Collier H.O.J., "Prostaglandin synthesis inhibitors". Robinson H.J. y Vane J.R. (eds). Raven Press. New York., p. 121 (1974).
- Connors K.A., Amidon G.L. y Stella V.J., "Chemical Stability of Pharmaceutical", 2a ed., John Wiley & Sons (eds.), New York (1986).
- Cooper S.A., Reynolds D.C., Kruger G.O. y Gottlieb S., J. Clin. Pharmacol., 20, 98 (1980).
- Cummins A.J. y King M.L., Nature, 209, 602 (1966).
- Das Gupta V., J. Pharm. Sci., 69, 113 (1980).
- Davidson C., Smith B.W. y Smith P.K., J. Pharm. Sci., 51, 759 (1962).
- DeBisschop M., J. Pharm. Belg., 25, 330 (1970).

- Delaucoux E., Pagniez M., Gousson T. y Cesbrou N., Therapie XXV, 553 (1970).
- Dennis R.F., Arch. Ophthalmology, 97, 2170 (1979).
- Diamond H.S., J. Rheumatol. Suppl. 2, 3, 67 (1976).
- Diamond H.S., Sterba G., Jayadeven K. y Meisel A.D., Adv. Exp. Med. Biol., 122A, 221 (1980).
- Diblasi F. y Gnudi A., Minerva Stomatologica, 29, 265 (1980).
- Dirección General de Farmacia y Productos Sanitarios y Coordinación de Prestaciones Farmacéuticas de la Secretaría General del INSALUD. CINIME., "Antiulcerosos", ficha de transparencia 3, Ministerio de Sanidad y Consumo (1988).
- Driscoll K.M. y Corrigan O.I., J. Pharm. Pharmacol., 35, 814 (1983).
- Ebstein W., Berliner Klinische Wochenschrift, 13, 337 (1876).
- Ebstein W. y Müller W., Berliner Klinische Wochenschrift, 12, 53 (1875).
- Edwards L.J., Trans Faraday Soc., 46, 753 (1950).
- Ekenved G., Elofsson R. y Solvell L., Acta Pharm. Suec., 12, 323 (1975).
- El-Banna H.M., Daabis N.A. y El-Fattah S., J. Pharm. Sci., 67, (11), 1631 (1978).

- Elie R., Durocher L-P. y Kavalec E.C., J. Int. Med. Res., 11, 108 (1983).
- El-Wood P.C. y col., Br. Med. J., 11, 436 (1988).
- Enezian G., Rev. Prod. Prob. Pharm., 23, 1 (1968).
- Essigman W.K., Chamberlein M.A. y Wright V., Annals Rheumatic Diseases, 38, 148 (1979).
- Evans G., Packham M.A., Nis Rizawa E.E., Mustard J.F. y Murphy E.A., J. Exp. Med, 128, 877 (1968).
- Fanelli G.M. y Weiner I.M., J. Pharm. Exp. Ther., 210, 186 (1979).
- Fara J.W. y Myrback R.E., Pharm. Reseach, 7, (6), 616 (1990).
- Farre A.J., Colombo M. y Gutierrez B., Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 11, (5), 303 (1989).
- Fernandez J., Tesis Doctoral, Fac. Farm., Dep. Farm. y Tec. Farm., U.C.M. (1989).
- Florence A.T. y Attwood D., "Physicochemical principles of pharmacy". 2nd ed. MacMillan Press, London (1988).
- Florey K., "Aspirin" en "Analytical profiles of drug substances". Vol. 8. Florey K. (ed). Academic Press. London p. 1(1979).

- Forbes J.A., White R.W., White E.H. y Hughes M.K., J. Clin. Pharmacol., 20, 465 (1980).

- Ford J.L., "Parenteral Products". In: Aulton M.E. (ed) *Pharmaceutics. The Science of Dosage Form Design*. Churchill Livingstone, Edinburg, p 359 (1988).

- Gadalla M.A.F., Ismail A.A. y Abd El-Hameed M.H., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 15, 447 (1989).

- Garrett E.R., J. Am. Chem. Soc., 79, 3401 (1957).

- Geber W.F., Lefkowitz S.S. y Hung C.Y., *Archiv. Int. Pharmacol. Ther.*, 214, 322 (1975).

- Ghebre-Sellagie I., *Pellets: A General Overview*. En: "Pharmaceuticall pelletization technology". Marcel Dekker. New York (1989).

- Gibaldi M. y Graudhofer B., J. Pharm. Sci., 64, 1064 (1975).

- Gibaldi M. y Weintraub H., J. Pharm. Sci., 59, 725 (1970).

- Gillies H.C., Rogers H.J., Spector R.G. y Trunce J.R., "A textbook of clinical pharmacology". 2nd ed. Edward Arnold. London. p. 292 (1986).

- Golomb G., Fisher P. y Rahamim E., J. Controlled Release, 12, (2), 121 (1990).

- Green D.M., J. New Drugs, 6, 294 (1966)

- Grenton E., "Acetylsalicylic acid: New uses for an old drug". Barnett H.J.M., Hirsch J. y Mustard J.F., Raven Press. New York p. 215 (1982).

- Grigor R.R. y col., J. Rheumatol., 14, 60 (1987).

- Harris PA y Riegelman S., J. Pharm. Sci., 56, 713 (1967).

- Henagan J.M., Schmidt K.L. y Miller T.A., Gastroenterology, 97, 649 (1989).

- Hepsö H.U., Lökken P., Björnson J. y Godel H.C., Eur. J. Clin. Pharmacol., 10, 217 (1976).

- Hial V., Horakova Z., Shaff R.E. y Beaven M.A., Eur. J. Pharmacol., 37, 367 (1976).

- Ho P.C. y col., Br. J. Clin. Pharmacokinet., 11, 250 (1986).

- Hoblitzell J.R. y Rhodes C.T., Drug Dev. Ind. Pharm., 16, 201 (1990 a).

- Hoblitzell J.R. y Rhodes C.T., Drug Dev. Ind. Pharm., 16, 469 (1990 b).

- Hollister L.E., Clin. Pharmacol. Therap., 13, 1 (1972)

- Hogan D.L., Am J. Med., 84 (suppl. 2A), 35 (1988).

- Hossenbocus A. y Colin-Jones D.G., "Protection of the human gastric mucosa from aspirin by carbenoxolone" 4th Symposium on Carbenoxolone, Butterworths, Mexico, p 91 (1974).

- Horrobin D.F., Headache, 17, 113 (1977).

- Hutlin M. y Olander K.J., "Proceedings of a Symposium on Rengasil. XIIth International Congress of Rheumatology". Paris. (1981).

- Insel P.A., "Analgesic-antipyretics and antiinflammatory agents; drugs employed in the treatment of rheumatoid arthritis and gout". En "The pharmacological basis of therapeutics". Goodman A, Rall TW, Nies AS y Taylor P. VIII ed. Pergamon Press, New York p. 638 (1990).

- Isaac V.O. y Thiemer K., Arzneim.-Forsch. (Drug Res.) 25, 9, 1352 (1975).

- Isis. Lancet 2, 349-360 (1988).

- Ivey K.J., Am. J. Med. 84 (suppl. 2A), 41 (1988).

- Jaffe S.Y., Arch. Intern. Med., 141, 286 (1981).

- Jakovlev V. y Schlichtegroll A., Arzneim.-Forsch., 19, 615 (1969).

- James K.C., J. Pharm. Pharmacol., 10, 363 (1958).

- Jaszewski R. y Crane S.A., Am. J. Gastroenterology, 82, (12), 1271 (1987).
- Jinno K., Hayashida M. y Watanabe T., J. Chromatogr. Sci., 28, (7), 367 (1990).
- Jorup-Rönström C. y col., Clin. Pharmacokinet., 11, 250 (1986).
- Jun H.W., Withworth C.W. y Luzzi L.A., J. Pharm. Sci., 61, 1160 (1972).
- Katz L.B. y Shriver D.A., J. Pharmacology Experimental Ther., 251, (2), 774 (1989).
- Katz L.B., Shriver D.A., Tobia A.J. y Rosenthale M.E., J. Pharm. Experimental Ther., 242, (3), 927 (1987).
- Kauffman G., Gastroenterology, 96, (2), 606 (1989).
- Kelly C.A., J. Pharm. Sci., 59, 1053 (1970).
- Khalil S.A.H. y El-Gamal S.S., Pharmazie, 28, 385 (1973).
- Khalil S.A.H., El-Gamal S.S. y Abdel Khalel M.M., Acta Pharm. Suec., 8, 423 (1971).
- Kimney M.B. y Silverstein F.E., Am. J. Med., 84 (Suppl. 2A), 49 (1988).

- Kitamura K. y Majima R., Anal. Chem., 55, 54 (1983).
- Knopp C. y Kienberger F., Acta Pharm. Technol., 35, (4), 218 (1989).
- Koch P.A., Schultz C.A., Wills R.J., Hallquist S.L. y Welling P.G., J. Pharm. Sci., 67, 1533 (1978).
- Kolthoff I.M., Sandell E.B., Meehan E.J., Bruckenstein S., "Análisis Químico Cuantitativo" 4 ed, Nigar S.R.L. (ed), Buenos Aires (1975).
- Kornblum S.S. y Zoglio M.A., J. Pharm. Sci., 56, 1569 (1967).
- Korttila K., Pentti O. y Auvinen J., Brit. J. Anes., 52, 613 (1980).
- Krans J.C., J. Am. Med. Women Assoc., 36, 13 (1981).
- Kucera J.L. y Bullock F.J., J. Pharm. Pharmacol., 21, 293 (1969).
- Lampert B.M. y Steward J.T., J. Chromatogr., 504, (2), 381 (1990).
- Langer P., Foldes O., Brozmanova H., Straussova K. y Gschwindtova K., Hormone Metab. Res., 13, 575 (1981).
- Lastres J.L., Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmaceutica, Universidad Complutense de Madrid, (1976).

- Lastres J.L., Torregrosa A., Torrado J.J. y Hernandez A., An. Real Acad. Farm., 47, 407 (1981).
- Laudanno O.M., Am. J. Med., 83 (suppl. 5A) 43 (1987).
- Lechat P., Gauter P., Fontagne J. y Flouvat B., Therapie, 22, 403 (1967).
- Lee P., Ahola S.J., Grennan D., Brooks P. y Buchanan W.W., British Med. J., 1, 424 (1974).
- Lee P., Anderson J.A., Miller J., Webb J. y Buchanan W.W., J. Rheumatol., 3, 283 (1976).
- Leeson L.J. y Mattocks A.M., J. Am. Pharm. Assoc., Sci. ed., 47, 329 (1958).
- Leigh S. Carless J.E. y Burt B.W., J. Pharm. Sci., 56, 888 (1967).
- Leonards J.R., Clin. Pharmacol. Therap., 4, 467 (1963).
- Leonards J.R. y Levy G., J. Am. Med. Assoc., 193, 99 (1965).
- Leonards J.R. y Levy G., Arch. Int. Med., 129, 457 (1972).
- Levenberger H. y Rohera B.D., Pharm. Res., 3, 12 (1986).

- Levy G., J. Pharm. Sci., 54, 959 (1965).
- Levy G. y Hollister L.E., Brit. Med. J., 2, 286 (1964).
- Levy G. y Jusko W.J., Clin Pharmacol. Therap., 8, 887 (1967).
- Levy G., Lampman T., Kamath B. y Garrettson L.K., N. Engl. J. Med., 293, 323 (1975).
- Levy G. y Leonards J.R., J. Am. Med. Assoc., 217, 81 (1971).
- Levy G. y Procknal J.A., J. Pharm. Sci., 51, 294 (1962).
- Levy G. y Sahli B.A., J. Pharm. Sci., 51, 58 (1962).
- Li Volsi V.A., Lancet, 4, 262 (1973).
- Lichtenberger L.M., Romero J.J., Kao Y.J. y Dial E.J., Gastroenterology, 99, 311 (1990).
- Lichtenberger L.M., Romero J.J., Kao Y.J. y Dial E.J., Gastroenterology, 99, 311 (1990).
- Lim J.K., Narang P.K., Overman D.O. y Jaknowitz A.I., J. Pharm. Sci., 68, 295 (1979).
- Lopez F.J., Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmaceutica, Universidad Complutense de Madrid, (1989).

- Lynch N.R., Castes M., Aston M. y Salmon J.S., Brit. J. Cancer, 36, 503 (1978).
- Majerns P.W. y Stanford N., Br. J. Clin. Pharmacol., 4, 158 (1977).
- Malmgren K., Ollsson P., Thornling G. y Unge G., Thrombosis Res., 13, 1137 (1978).
- Malton J.W., Lussier A., Ward J.R., Neistadt D. y Multz C., J. Rheumatol., 5, 338 (1978).
- Martindale. The extra Pharmacopoeia 29th ed. Reynolds J.E.F. (ed.). The Pharmaceutical Press. London (1989).
- Maudlin H.V., Zoglio M.A., Pigois F.E. y Wagner M., J. Pharm. Sci., 58, 1359 (1969).
- Mazzeo P., Quaglia M.G., Segnalini F., J. Pharmacol., 34, 470 (1982).
- Mehlish D.R., J. Oral Surgery, 39, 426 (1981).
- Melzig M., Pharmazye, 45, (11), 869 (1990).
- Merck Index 11th ed. Merck & Co. Inc. New Jersey (1989).
- Miners J.O. y col., Br. J. Clin. Pharmac., 22, 135 (1986).

- Montgomery P.R. y col., Clin. Pharmac. Ther., 39, 571 (1986).
- Moncada S. y Vane J.R., Drugs, 21, 430 (1981).
- Morgan R.J., Nelson L.M., Russell R.I. y Docherty C. J. Pharm. Pharmacol., 35, 605 (1983).
- Morris H.M., Cristian J.E. y Hansen W.G., J. Pharm. Sci., 60, (5), 790 (1971).
- Mueller T., Weisenberger H., Brickl R., Nehmiz G. y Eisert W.G., Br. J. Clin. Pharmacol., 30, (2), 179 (1990).
- Mustard J.F., "Acetylsalicylic Acid: New uses for an old drug". Barnett HJM, Hirsch J y Mustard JF. Raven Press. New York. p. 195 (1982).
- Nelson E., Eppich D. y Carstensen J.T., J. Pharm. Sci., 63, 755 (1974).
- Netter P. y col., Clin. Pharmac. Ther., 38, 6 (1985).
- Nordestgaard A.G., Marcus C.S. y Wilson S.E., Platelets, 1, (1), 37 (1990).
- O'Brien J.R., Lancet, 1, 779 (1968).
- Okabe S., Takeuchi K., Honda K. y Takagi K., Arzneim.-Forsch., 26, (4), 534 (1976).

- Oxman T.E., Hitzemann R.J. y Smith R., Headache, 22, 261 (1982).
- Parmar N.S., Tariq M. y Ageel A.M., Gastric Applied Pharmacol., 92, 122 (1988).
- Parrot E.L., "Compression". En: Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. vol. 2, Lieberman H.A. y Lachman L. (eds.), Marcel Dekker Inc., New York p. 153 (1981).
- Paulus H.E. y Furst D.E., "Arthritis and allied conditions". Carthy DJ (ed.). Lea and Fabiger. Filadelfia. p. 331 (1979).
- Peraire C., "Parámetros Farmacocinéticos de Biodisponibilidad y Bioequivalencia tras dosiss únicas y repetidas".. Jornadas sobre estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia, Madrid p. 18 (1991).
- Peto R., Gray R. y col., Br. Med. J. (ed. esp.), 3, 56 (1988).
- Petri G.V., Szegi J. Marczal G., "Pharmacological effect of certain camomile mompounds" Acta Pharm. Hung., 49, (1), 13 (1979).
- Pihan G., Regillo B.A. y Szabo S., Digestive Diseases Sciences, 32, (12), 1395 (1987).
- Postlethwaite A.E., Gutman R.A. y Kelley W.N., Metabolism, 23, 771 (1974).

- Powles T.J., Clarck S.A., Easty G.C., Easty D.M. y Neville A.M., Nature New Biol., 245, 83 (1973).
- Ragnarsson G. y Sjögren J., Int. J. Pharm., 12, 163 (1982).
- Rainsford K.D., Am. J. Dig. Dis., 23, 521 (1978).
- Rainsford K.D., Rheumatol. Int., 2, 1 (1982).
- Rainsford K.D., "Anti-Inflammatory compounds". Williamson W.R.N. (eds.). Marcel Dekker. New York (1984).
- Rainsford K.D., Peskar B.M. y Brume K., J. Pharm. Pharmacol., 33, 127 (1980).
- Rao K.V. y Buri P., Acta Pharm. Technol., 35, (4), 256 (1989).
- Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales "Vocabulario Científico y Técnico". Espasa Calpe. (1990).
- Reynold R.C. y Cluff L.E., Bull. Johns Hopkins Hosp., 107, 278 (1960).
- Richards J.H., "Solubility and Dissolution Rate" En: Pharmaceutics. The Science Dosage Form Design. Aulton M.E. (ed.), Churchill Livingstone, Edinburg, p. 62 (1988).
- Roberts M.S., Eur. J. Clin. Pharmac., 25, 253 (1983).

- Roberts M.S., Joyce R.M., McLeod L.J., Vial J.H. y Seville P.R., Lancet, 1, 1153 (1986).
- Roberts M.S., McLeod L.J., Cossum P.A. y Vial J.H., Eur. J. Clin. Pharmacol., 27, 76 (1984).
- Roberts R.J. y Rowe R.C., Int. J. Pharm., 36, 205 (1987).
- Röhm Pharma, Info RL/RS-1/5 (1979 a).
- Röhm Pharma, Info L/S-1/5 (1979 b).
- Röhm Pharma, Info E-1/5 (1978).
- Rowland M. y Riegelman S., J. Pharm. Sci., 57, 1313 (1968).
- Rowland M., Riegelman S., Harris P.A. y Sholkoff S.D., J. Pharm. Sci., 61, 379 (1972).
- Rowland M., Riegelman S., Harris P.A., Sholkoff S.D. y Eyring E.J., Nature, 215, 413 (1967).
- Rumble R.H. y Roberts M.S., J. Chromat., 225, 252 (1981).
- Salenius J.P. y col., Eur. J. Vasc. Surg., 61, 271 (1989).
- Saleh S.I. y Atamm A., S.T.P. Pharma, 4, 10 (1988).

- Salim A.S., J. Pharm. Pharmacol., 39, 553 (1987).

- Salzman E.W. y Harris W.H., "Acetyl salicylic acid: new uses for an old drug". Barnett HJM, Hirsch J y Mustard JF. Raven Press. New York. p. 225 (1982).

- Schiff E. y col., N. Eng. J. Med., 321, 351 (1989).

- Schlosstein L.H., Kippen I., Whitehouse M.W., Bluestones R., Paulus H.E. y Klinenberg J.R., J. Lab. Clin. Med., 82, 412 (1973).

- Silverstein F.E., Kimney M.B., Saunders D.R. y Levine D.S., Digestive Diseases and Sciences, 31, (2), 137S (1986).

- Silverstein F.E., Kimney M.B., Saunders, D.R. Surawicz C.M., Willson R.A. y Silverman B.A., Am. J. Med. 83 (Suppl. 1A), 32, (1987).

- Simon L.S. y Mills J.A., New Eng. J. Med., 302, 1179 (1980).

- Smith M.J.H. y Dawkins P.D., J. Pharm. Pharmacol., 23, 729 (1971).

- Stambaugh J.E. y Sarajian C.N., J. Clin. Pharmacol., 21, 501 (1981).

- Stern A.I., Ward F. y Hartley G., Am. J. Med. 83 (Suppl. 3B), 83 (1987).

- Szabo S. Trier J.S. y Frankel P.W., Science, 214, 200 (1981).

- Tico G.J.R., Del Pozo C.A., Salazar M.R. y Alonso C.S., *Industria Farmacéutica*, 1, 95 (1989).

- Tolstikov G.A., Murinov Y.I. y Baltina L.A., *Khim-Farm. Zh.*, 24, (8), 26 (1990).

- Tomankova H. y Vasatova M., *Pharmazie*, 44, (3), 197 (1989).

- Trinder P., *Biochem J.*, 57, 301 (1954).

- Trnavská Z. y Trnavsky K., *Eur. J. Clin. Pharmac.*, 25, 679 (1983).

- Truitt E.B. y Morgan A.M., *J. Pharm. Sci.*, 53, 129 (1964).

- UK-TIA study group., *Br. Med. J.*, 296, 316 (1988).

- Underwood T.W. y Cadwallader D.E., *J. Pharm. Sci.*, 61, 239 (1972).

- Vanags D., Rodgers S.E., Lloyd J.J. y Bochner F., *Thromb Res.*, 59, (6), 995 (1990).

- Van Kalfschoten A.A., Dembinska-Kiec A. y Basista M., *J. Pharm. Pharmacol.*, 33, 462 (1981).

- Verain A., *S.T.P. Pharma*, 3, 70, (1987).

- Veresh S.A., Hom F.S. y Miskel J.J., J. Pharm. Sci., 60, 1092, (1972).
- Vignalou J. y Beck H., Therapie, 22, 967 (1967).
- Vik-mo H., Hove K. y Mjos O.D., Acta Physiol. Scan., 103, 113 (1978).
- Weiss H.J., Aledort L.M. y Kochwa S., J. Clin Inv., 47, 2169 (1968).
- Whitehouse M.W. y Rainsford K.D., Toxicology Applied Pharmacol. 68, 323 (1983).
- Whitworth C.W., Luzzi L.A., Thomson B.B. y Juni H.W., J. Pharm. Sci., 62, 1372 (1973).
- Wiseman E.H., Curr. Ther. Res., 11, 681 (1969).
- Wong L.W. y Pilpel N., Int. J. Pharm., 59, 145 (1990).
- Wood J.H., J. Pharm. Sci., 54, 1207 (1965).
- Wood S. y Hilgard P., Lancet, 2, 1416 (1972).
- Yamada Y., Furui H., Furumichi T., Suzuki T., Yamauchi K., Yokota M., Yayashi H. y Saito H., Jpn. Heart J., 31, (2), 201 (1990).
- Yamamoto M., Saito S., Kaise K., Kaise N., Yoshida K. y Yoshinga K. Tohoku, J. Exp. Med., 127, 85 (1979).

- Zoglio M.A., Mandling H.V., Haller R.M. y Briggen S., J. Pharm. Sci. 57, 1877 (1968).

- Zucker M.B. y Peterson J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127, 547 (1968).

Presidencia:
Dr. LASTRES
Vocales:
Dr. SELLES
Dr. ZARAGOZA
Dr. ^a CAYRE
Secretarios:
Dr. ^a FRUTOS

Reunida, en el día de hoy, el Tribunal para el
examen se expresa, para juzgar este trabajo, por
acordó por UNANIMIDAD el dictamen
de APTO "CUM LAUDE" por unanimidad

Madrid, 10 de julio de 1922

El Secretario del Tribunal

Roberto Frutos